

Année 2016

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE

Par Jonathan VISENTIN

Né le 22 juillet 1984 à Agen

PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS ANTI-HLA
EN TRANSPLANTATION D'ORGANES

Sous la direction du Professeur Jean-Luc TAUPIN

Soutenue le 5 Avril 2016

Membres du jury :

Mr le Pr Pierre Merville, PU-PH, Université de Bordeaux.....	Président
Mme le Dr Danièle Altschuh, DR, Université de Strasbourg.....	Rapporteur
Mr le Pr Olivier Thaumat, PU-PH, Université de Lyon.....	Rapporteur
Mr le Pr Jean-Marie Tiercy, Associate Professor, Université de Genève.....	Examinateur
Mr le Pr Nassim Kamar, PU-PH, Université de Toulouse.....	Examinateur

REMERCIEMENTS

Au Professeur Jean-Luc Taupin,

Tu es la première personne que je tenais à remercier. Pour m'avoir fait entrer dans le monde du HLA malgré mes premières (néanmoins brèves) réticences, transmis ta passion et une partie de ton savoir. Pour m'avoir fait confiance durant ces quatre années. Pour tout le travail accompli et les projets de collaboration à venir.

Au Docteur Danièle Altschuh et au Professeur Olivier Thaunat, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Aux Professeurs Jean-Marie Tiercy et Nassim Kamar, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Au Professeur Pierre Merville, pour avoir accepté d'être le Président du jury de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a attribué ces quatre dernières années et le travail accompli, que nous accomplissons et que nous accomplirons ensemble.

Au Docteur Julie Déchanet-Merville,

Pour l'accueil que tu m'as réservé au sein de ton groupe et l'intérêt porté à mon travail.

Aux Professeurs Jean-François Moreau et Patrick Blanco,

Pour la considération que vous m'avez attribuée depuis mon passage en tant qu'interne au sein du laboratoire, puis la confiance que vous me témoignez et l'aide que vous m'apportez aujourd'hui.

Au Docteur Carmelo Di Primo,

Pour ta patience lors de ma formation et l'écriture du papier sur la CFCA capture, notamment le graphical abstract ! Pour tout le travail accompli et les projets de collaboration à venir.

A Laëtitia Minder,

Pour m'avoir formé à l'utilisation du Biacore T200.

A tous les membres du CIRID et/ou de la nouvelle UMR CNRS 5164,

Qu'ils soient chercheurs, étudiants ou ITA, pour votre accueil et l'aide que vous m'avez apportée à un moment ou à un autre. Je tiens à remercier plus particulièrement Sophie et Vincent pour toutes les choses qu'ils m'ont apprises, et Annie pour ses réponses à mes questions administratives.

A tous les membres du laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique,

Qu'ils soient biologistes ou techniciens, ex-internes ou externes, pour la confiance que vous m'accordez ou la formation que vous m'avez dispensée, pour votre accueil et l'aide que vous m'avez apportée à un moment ou à un autre. Je tiens à remercier plus particulièrement Gwendaline et Mamy, les techniciennes d'immunogénétique et les techniciennes du secteur « humorale », qui ont participé à une partie des travaux qui constituent cette Thèse.

A tous les cliniciens transplantateurs du CHU de Bordeaux,
Plus particulièrement le Professeur Lionel Couzi, les Docteurs Claire Dromer, Martine Neau-Cransac, Marc-Alain Billes, Bachelet Thomas, Moreau Karine, Delphine Morel, Elodie Blanchard, Albane Chartier, Karine Nubret-Coniat, Vincent Veniard. Pour la confiance que vous m'accordez et le travail accompli, que nous accomplissons et que nous accomplirons ensemble.

A toutes les personnes extérieures à Bordeaux qui ont contribué à ce travail,
Les Docteurs Jar-How Lee, Valérie Dubois, Véronique Frémeaux-Bacchi, Christian Jacquelinet, Benoît Audry, ainsi que Thoa Nong. Merci de votre collaboration et de votre aide.

A mes parents,
Pour avoir cru en moi et m'avoir encouragé tout au long de ces années. Que cette deuxième thèse témoigne de nouveau de mon respect et de mon amour.

A mes sœurs,
Pour tous les bons moments passés ensemble et surtout ceux qui restent à venir. Sachez tout l'amour que je vous porte et à quel point je savoure les occasions de nous retrouver.

A mes grands-parents, Tatie Monique et ma marraine Andrée,
Ne pouvant être présents aujourd'hui. Je pense bien fort à vous.

A mes amis,
Qu'ils soient d'enfance, de l'université, anciens collègues internes ou travaillant à l'hôpital. Pour tous les instants passés ensemble à rire, s'amuser, discuter, partager et travailler. Il n'existe pas de meilleur moyen de s'enrichir que de découvrir les particularités de chacun et de partager ses expériences. Ne changez rien, vous êtes parfaits.

A Georges,
Merci de nous avoir accueillis au fond de ton fjord, j'espère que la pêche est toujours bonne et bien le bonjour à ta colonie. Au plaisir de te revoir.

A Julia,
Pour avoir été si compréhensive durant ces huit années, et celles qui restent à venir ! Pour avoir élargi mes champs d'intérêt et ouvert de nouveaux horizons. Pour les merveilleux moments passés ensemble et ceux qu'il nous reste à partager.

TABLE DES MATIERES

I - LISTE DES FIGURES	7
II - LISTE DES TABLEAUX	8
III - LISTE DES ABREVIATIONS	9
IV - INTRODUCTION	10
1 ANTICORPS	10
1.1 Structure	10
1.2 Portion Fab et reconnaissance antigénique	11
1.3 Répertoire des anticorps	12
1.4 Interaction antigène-anticorps : affinité et avidité	13
1.5 Résonance plasmonique de surface (SPR)	15
1.5.1 Principe de la SPR	15
1.5.2 Détermination de l'affinité d'un complexe par la SPR	18
1.5.3 <i>Calibration-free concentration analysis</i> par la SPR	19
1.5.4 Limites de la SPR	20
1.6 Fc, classes d'Ig et fonctions effectrices	21
1.7 Système du complément	24
2 SYSTEME HLA (HUMAN LEUCOCYTE ANTIGENS)	26
2.1 Structure des molécules HLA	26
2.2 Polymorphisme des molécules HLA	28
2.3 Expression des molécules HLA	30
2.4 Fonction des molécules HLA	31
2.5 Molécules HLA en transplantation d'organe	32
3 ANTICORPS ANTI-HLA	35
3.1 Anticorps anti-HLA : épitopes reconnus	35
3.2 Anticorps anti-HLA : origine	38
3.2.1 Génération des cellules productrices d'anticorps anti-HLA	38
3.2.2 La grossesse	39
3.2.3 Les transfusions	40
3.2.4 La transplantation d'organes	40
3.2.5 Anticorps anti-HLA « naturels »	41
3.3 Anticorps anti-HLA : pathogénicité	41
3.3.1 Activation du complément	42
3.3.2 Interaction avec les récepteurs des fragments Fc	44
3.3.3 Activation des cellules endothéliales	44
3.4 Anticorps anti-HLA en transplantation d'organe	46
3.4.1 Les DSA préformés	46
3.4.2 Les DSA <i>de novo</i>	47
3.4.3 Caractéristiques du rejet humoral	48
3.5 Traitement des rejets liés aux anticorps anti-HLA	51
3.6 Anticorps anti-HLA : techniques de détection	52
3.6.1 La microlymphocytotoxicité	52
3.6.2 Le crossmatch par cytométrie en flux	53
3.6.3 Les techniques ELISA	53
3.6.4 La technologie Luminex®	53
3.7 <i>Single Antigen</i> Luminex® : interprétation, limites et adaptations	54
3.7.1 Signification des MFI et seuils de décision	54
3.7.2 Les interférences médicamenteuses	55
3.7.3 Les interférences négatives	55

3.7.4	Les antigènes dénaturés.....	56
3.7.5	Classes et sous-classes d'immunoglobulines	57
3.7.6	Activation et fixation du complément.....	58
3.7.7	DSA intra-greffe	58
V	OBJECTIFS GENERAUX DE NOTRE TRAVAIL	59
VI	Première partie : Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I	60
VI-1	Premier article : Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I chez les patients en attente de transplantation rénale : prévalence, signification clinique et impact sur l'attribution des greffons.....	61
VI-2	Deuxième article : Analyse épitopique de la réponse humorale dirigée contre les molécules HLA natives ou dénaturées en transplantation d'organe	99
VI-3	Troisième article : Evaluation des iBeads pour la détection des anticorps anti-HLA de classe I	134
VI-4	Quatrième article : Impact clinique des anticorps anti-HLA dénaturé de classe I préformés et dirigés contre le donneur en transplantation rénale.....	166
	<i>Crossmatches</i>	173
VI-5	Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I - Discussion des résultats	194
VII	Deuxième partie : Interférences négatives en Single Antigen Luminex®	198
VII-1	Cinquième article : Analyse de l'interférence liée au complément dans les tests utilisés pour la détection et l'identification des anticorps anti-HLA en format Luminex®	199
VII-2	Sixième article : Analyse de l'interférence liée aux IgM pour la détection des IgG anti-HLA dans les tests en format Luminex®.....	225
VII-3	Interférences négatives - Discussion des résultats	260
VIII	Troisième partie : Interaction des anticorps anti-HLA avec le greffe.....	262
VIII-1	Septième article : La présence de DSA intra-greffe est un facteur de risque de perte du greffe en transplantation pulmonaire	263
VIII-2	Huitième article : Utilisation de la résonance plasmonique de surface pour la mesure de la concentration et de l'affinité des anticorps anti-HLA.....	293
VIII-3	Interaction des anticorps anti-HLA avec le greffe - Discussion des résultats ...	332
IX	PERSPECTIVES	335
X	CONCLUSION	338
XI	BIBLIOGRAPHIE.....	339

I - LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général d'une immunoglobuline	10
Figure 2 : Dualité structurale et fonctionnelle des immunoglobulines	10
Figure 3 : Les CDR constituent le paratope	11
Figure 4 : Diversité combinatoire (exemple de la chaîne lourde)	12
Figure 5 : Hypermutations somatiques et affinité	13
Figure 6 : Principe de la résonance plasmonique de surface.....	16
Figure 7 : Transport de masse puis interaction avec le ligand	17
Figure 8 : Analyses cinétiques en mode « single-cycle » (haut) et « multi-cycle » (bas).....	18
Figure 9 : Limitation de transport de masse et vitesse d'injection.....	19
Figure 10 : Classes des immunoglobulines (gauche) et sous-classes d'IgG (droite)	21
Figure 11 : Organisation des gènes codant les régions constantes des chaînes lourdes.....	23
Figure 12 : Les trois voies du complément	24
Figure 13 : Complexe majeur d'histocompatibilité humain.....	26
Figure 14 : Structure d'une molécule HLA de classe I.....	27
Figure 15 : Structure d'une molécule HLA de classe II.....	27
Figure 16 : Transmission parental des haplotypes HLA	30
Figure 17 : Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe I	31
Figure 18 : Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe II.....	32
Figure 19 : Allo-reconnaissance par les lymphocytes T	33
Figure 20 : Allo-reconnaissance directe et indirecte	34
Figure 21 : Production des anticorps anti-HLA	38
Figure 22 : Mécanismes d'agression du greffon par les anticorps anti-HLA	42
Figure 23 : Survie du greffon rénal selon la période de greffe	46
Figure 24 : Evolution naturelle du rejet humoral en transplantation rénale.....	50
Figure 25 : Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I.....	56

II - LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Particularités des classes et sous-classes d'immunoglobulines.....	23
Tableau 2 : Allèles et protéines HLA.....	28
Tableau 3 : Nomenclature HLA en sérologie : les antigènes HLA.....	29
Tableau 4 : Exemple de fréquences d'allèles HLA-A et HLA-DRB1 au sein de différentes populations	30
Tableau 5 : Différence entre donneur/receveur et charge épitopique	36

III - LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Ag-Ac : antigène-anticorps
AID : *activation-induced cytidine deaminase*
Anti-dHLA : anticorps anti-HLA dénaturé
Anti-nHLA : anticorps anti-HLA natif
BCR : *B-cell receptor*
CAM : complexe d'attaque membranaire
CAV : *chronic allograft vasculopathy*
CDR : *complementarity determining region*
CFCA : *calibration-free concentration analysis*
CLAD : *chronic lung allograft dysfunction*
CMF : cytométrie en flux
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CREG : *cross-reactive group*
DSA : *donor specific antibody(ies)*
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
Fab : fragment *antigen binding*
Fc : fragment *crystallizable*
FcγR : récepteur des fragments Fc des IgG
FcR : récepteur des fragments Fc
FcRn : récepteur néonatal des fragments Fc
FHC : *free-heavy chain*
gDSA : *intra-graft DSA*
HLA : *human leukocyte antigen*
Ig : immunoglobuline
 k_a : constante d'association
 k_d : constante de dissociation
 K_D : constante de dissociation à l'équilibre
KIR : *killer-cell immunoglobulin like receptor*
LCT : microlymphocytotoxicité dépendante du complément
NK : lymphocyte *natural killer*
NSB : *non-specific binding*
PBL : *peripheral blood lymphocytes*
PRA : *panel reactive antibodies*
RAG : *recombination-activating gene*
RAS : *restrictive allograft syndrome*
RU : *resonance unit*
SAG : *single antigen* en format Luminex®
SPR : résonance plasmonique de surface
TdT : *terminal-desoxynucleotidyl-transferase*
Tfh : lymphocytes T folliculaires
TGI : taux de greffons incompatibles
XM : crossmatch
VT : vasculopathie du transplant

IV - INTRODUCTION

1 ANTICORPS

1.1 Structure

Les anticorps, ou immunoglobulines, sont les principaux effecteurs de l'immunité adaptative à médiation humorale. Ils sont sécrétés par les cellules de la lignée lymphocytaire B. Ce sont des glycoprotéines constituées de quatre sous-unités identiques deux à deux : deux chaînes lourdes (H pour *heavy*) de 450 à 600 acides aminés, et deux chaînes légères (L pour *light*) de 210 à 220 acides aminés. Les chaînes légères sont de deux types, κ et λ , et sont constituées d'un domaine variable et d'un domaine constant. Ce dernier est lié à la chaîne lourde par un pont disulfure. Le poids moléculaire des deux types de chaînes légères est similaire : de l'ordre de 25 kDa. Il existe un plus grand nombre de chaînes lourdes différentes. Elles sont constituées d'un domaine variable et de 3 ou 4 domaines constants, avec une région charnière située entre le premier et le deuxième des domaines constants. La taille des chaînes lourdes étant différentes en fonction des classes et sous-classes d'immunoglobulines, leur poids moléculaire est variable, de 50 à 70 kDa (1).

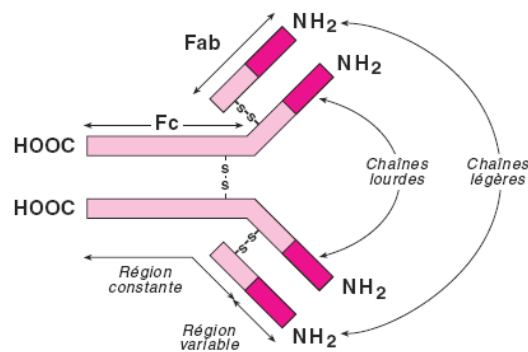


Figure 1 : Schéma général d'une immunoglobuline

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Les immunoglobulines possèdent une dualité structurale et fonctionnelle : elles peuvent être décomposées en Fab (Fragment *antigen binding*) et Fc (Fragment *crystallizable*).

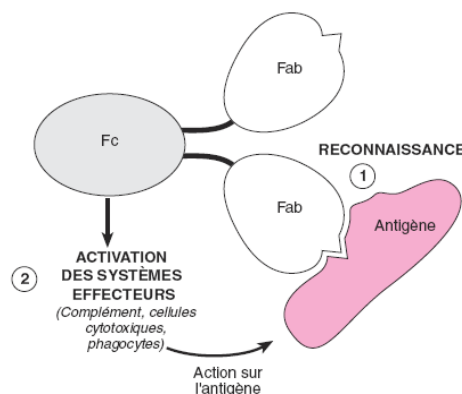


Figure 2 : Dualité structurale et fonctionnelle des immunoglobulines

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Un Fab est constitué d'une chaîne légère associée à la partie variable et au premier domaine constant d'une chaîne lourde d'immunoglobuline. Le Fab contient les régions variables des chaînes lourdes et légères, en termes de séquence d'acides aminés, qui confèrent à l'anticorps sa spécificité et sa force de liaison à un épitope donné. Le Fc est constitué du reste des domaines constants de la chaîne lourde et confère à l'anticorps ses fonctions effectrices (2).

1.2 Portion Fab et reconnaissance antigénique

Les différences entre régions variables des anticorps sont concentrées dans trois zones de quelques acides aminés appartenant à chacune des chaînes lourdes et légères et constituant les zones hypervariables, encore appelées régions déterminant la complémentarité (CDR). Celles-ci sont entourées du reste des parties variables constituant la charpente ou *framework region*. Les trois CDR de la chaîne lourde coopèrent avec les trois CDR de la chaîne légère pour constituer le paratope. Le paratope est une structure associant 6 boucles d'acides aminés (H1, H2, H3 pour les CDR1, 2 et 3 de la chaîne lourde et L1, L2, L3 pour ceux de la chaîne légère) pouvant adopter un nombre limité de conformations (3, 4).

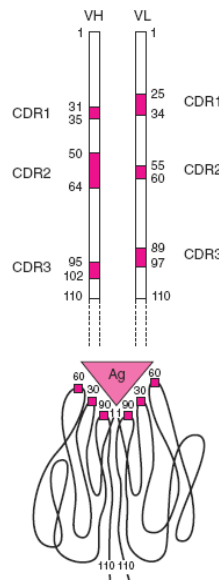


Figure 3 : Les CDR constituent le paratope

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

La troisième région CDR de la chaîne lourde (CDR-H3) se situe en général au centre du site de fixation antigénique et jouerait un rôle majeur dans la reconnaissance de l'épitope, qui est la partie de l'antigène permettant la liaison de l'anticorps (5, 6). Les 5 autres CDRs ont une variabilité moindre et joueraient un rôle de stabilisation de la liaison du CDR-H3. Les chaînes latérales des acides aminés constituant le paratope définissent la structure des épitopes qui pourront être reconnus grâce à l'établissement de liaisons de Van der Waals, de ponts électrostatiques, de liaisons hydrogène ou d'interactions hydrophobes. C'est la force de ces liaisons qui influence l'affinité d'un paratope pour l'épitope reconnu. Par ailleurs, l'existence de deux Fab identiques par molécule d'immunoglobuline permet d'augmenter la force de liaison à l'antigène, à condition que celui-ci exprime plusieurs exemplaires de l'épitope à une distance suffisamment proche : c'est le phénomène d'avidité (7).

Les analyses stéréochimiques des complexes antigène/anticorps ont permis de définir un « épitope structural » comme la part d'un antigène qui entre en contact avec les 6 CDR d'un anticorps (8). La surface de contact est de l'ordre de 700 à 850 angströms carrés, c'est-à-dire une structure composée de 15 à 25 acides aminés (9, 10). Au sein de l'épitope structural se situe « l'épitope fonctionnel » comportant des résidus d'acides aminés situés dans des zones dites « hot spots » dont la substitution par un autre résidu aboutit à une diminution significative de la liaison de l'anticorps avec l'épitope (11, 12).

1.3 Répertoire des anticorps

Le répertoire des anticorps d'un individu, c'est-à-dire le nombre de Fab différents, est généré grâce à plusieurs processus successifs permettant au système immunitaire humain de répondre à des milliards de structures moléculaires différentes. Le premier processus implique un réarrangement des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères. La région variable des chaînes lourdes contient trois segments géniques appelés V (variable), D (diversité) et J (jonction) alors que les chaînes légères n'en contiennent que deux : V et J. Il existe plusieurs copies de chaque segment de gènes et les multiples exemplaires de chacun des segments de V, (D) et J peuvent, en théorie, s'associer de façon indépendante et aléatoire. Ce phénomène constitue la diversité combinatoire, possible par l'action de différentes enzymes dont les RAG 1 et 2 (*recombination-activating gene*). Environ 320 combinaisons VJ sont possibles pour les chaînes légères et 9000 VDJ pour les chaînes lourdes, ce qui représente environ 3 millions de domaines variables différents d'immunoglobulines (13-15).

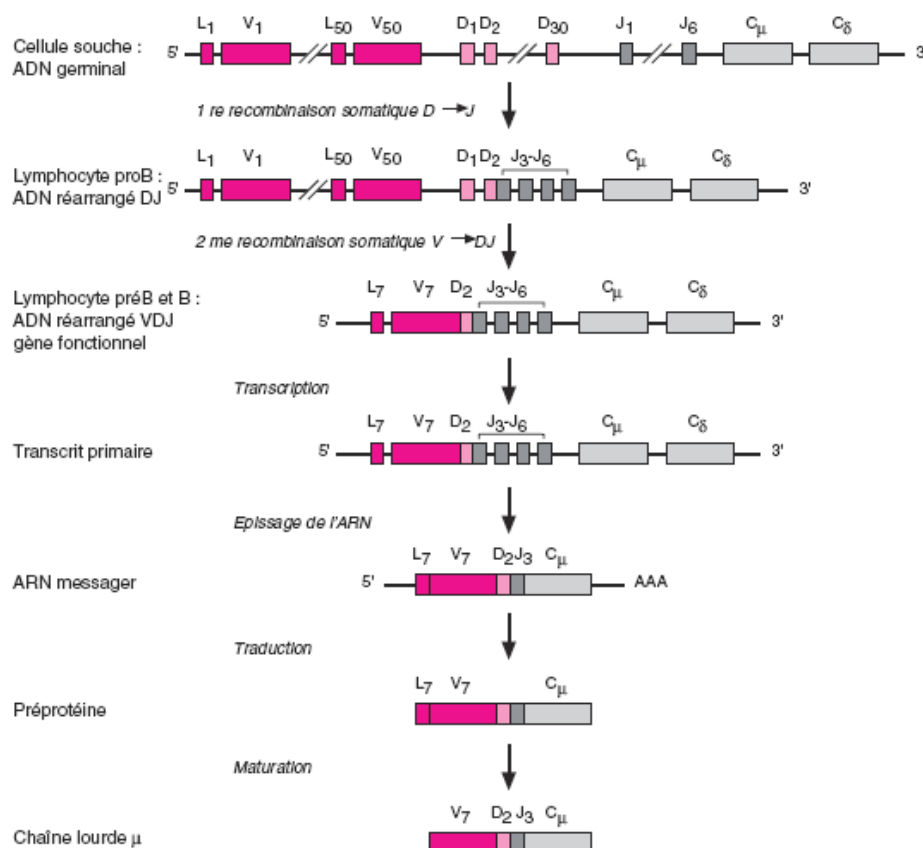


Figure 4 : Diversité combinatoire (exemple de la chaîne lourde)

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Des modifications supplémentaires ont lieu durant la combinaison, c'est-à-dire des insertions et des délétions de nucléotides réalisées sous l'action de la *terminal-desoxynucleotidyl-transferase* (TdT), plus particulièrement au niveau de la jonction entre les segments V, D et J qui codera pour la troisième région hypervariable de la chaîne lourde : c'est la diversité jonctionnelle qui permet d'augmenter considérablement le potentiel de variabilité des structures paratopiques (16).

Les deux premiers processus exposés se déroulent au sein des lymphocytes B immatures, dans la moelle osseuse. Schématiquement, seuls les lymphocytes B immatures produisant une combinaison de chaînes légères et lourdes fonctionnelle, et ne reconnaissant pas des antigènes du soi (tolérance centrale), quitteront la moelle osseuse pour devenir des lymphocytes B matures « naïfs ». Ces derniers circulent alors dans le sang périphérique, le circuit lymphatique et les organes lymphoïdes secondaires, jusqu'à ce qu'ils rencontrent un antigène qu'ils sont capables de reconnaître. A cet instant, l'internalisation de l'antigène puis sa présentation sous forme de peptides aux lymphocytes T peut engendrer un troisième processus de diversification du répertoire au niveau des gènes d'immunoglobulines déjà réarrangés, l'hypermutation somatique (17, 18). Il s'agit de mutations au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères, principalement mais de manière non exclusive au niveau des régions hypervariables, sous l'action de l'*activation-induced deaminase* (AID). Ces mutations s'accumulent au fur et à mesure du développement de la réponse immunitaire et peuvent s'associer à une augmentation de l'affinité des anticorps pour l'antigène (19).

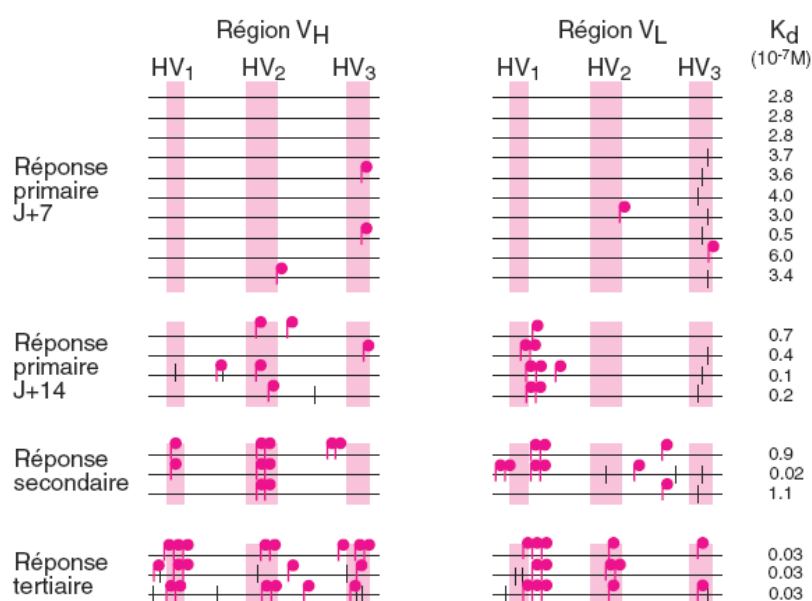


Figure 5 : Hypermutations somatiques et affinité

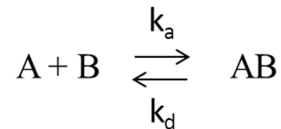
D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

1.4 Interaction antigène-anticorps : affinité et avidité

Comme évoqué précédemment, les interactions non covalentes régissant la force de la liaison antigène-anticorps (Ag-Ac) incluent des liaisons hydrogènes, ioniques, interactions hydrophobes et de van der Waals (12, 20, 21). La force de chacune de ces interactions est faible en comparaison à une liaison covalente, et donc une interaction Ag-Ac de qualité

nécessite de multiples interactions entre le paratope et l'épitope. De plus, ce type d'interaction ne pouvant exister qu'à des distances très courtes, de l'ordre de l'angström (10^{-10} mètre), un haut degré de complémentarité entre l'antigène et l'anticorps est nécessaire pour avoir une liaison forte, ce qui sous-tend également la grande spécificité des interactions Ag-Ac.

La force des interactions totales non covalentes entre un seul paratope d'un anticorps et un épitope porté par l'antigène est appelée affinité. Les anticorps de faible affinité se lient de manière moins forte à l'antigène et tendent donc à se dissocier facilement, tandis que les anticorps de forte affinité se lient de manière plus intense et se dissocient difficilement. La liaison entre un paratope d'un anticorps (A) et un épitope (B) d'un antigène peut être décrite par l'équation suivante :



où k_a est la constante de vitesse d'association, exprimée en $M^{-1}s^{-1}$, et k_d la constante de vitesse de dissociation, exprimée en s^{-1} . Le rapport k_a/k_d correspond à la constante d'association à l'équilibre K_A , exprimée en M^{-1} , qui peut être déterminée à partir des concentrations molaires du complexe A-B et de celles des anticorps et antigènes non liés à l'équilibre de la réaction :

$$K_A = \frac{[AB]}{[A] [B]}$$

Cependant, l'affinité est plus souvent représentée par la constante de dissociation à l'équilibre K_D , exprimé en M, qui est l'inverse du K_A :

$$K_D = \frac{[A] [B]}{[AB]}$$

Le K_D est un indicateur quantitatif de la stabilité d'un complexe Ag-Ac et constitue la concentration d'anticorps nécessaire pour atteindre 50% de la saturation des sites épitopiques disponibles. Les complexes très stables ont donc un K_D faible et les moins stables un K_D haut. On considère que les complexes Ag-Ac de faible affinité ont un K_D de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M, les complexes de haute affinité pouvant avoir des K_D atteignant 10^{-11} M.

Un anticorps possédant deux Fab lorsqu'il est monomérique (IgG), voire plus lorsqu'il est polymérique (IgM), l'affinité d'un paratope pour son épitope ne reflète pas toujours la force de liaison Ag-Ac. En effet, un antigène portant de multiples exemplaires de l'épitope pourra augmenter la force de liaison Ag-Ac si plusieurs paratopes sont engagés en même temps, la liaison du premier paratope augmentant la probabilité de liaison des paratopes suivants. La force de telles interactions multiples est appelée avidité, qui peut être une mesure de la capacité de liaison d'un anticorps à un antigène au sein des systèmes biologiques plus réelle que l'affinité.

Dans des conditions idéales, l'avidité devrait être le produit des affinités des sites de liaison individuels d'un anticorps, par exemple, pour une IgG ayant deux sites de liaison à l'antigène, l'avidité serait :

$$\text{Avidité} = K_A \times K_A = K_{eq} = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

Cette équation représente l'avidité maximale théorique, sachant que les avidités réelles sont toujours plus basses de plusieurs ordres de grandeur que le produit des affinités. En effet, le site de liaison d'un anticorps en contact avec un épitope unique d'un antigène peut facilement adopter une configuration spatiale optimale, alors que la liaison à un deuxième site implique que les deux épitopes soient suffisamment proches et bien orientés l'un par rapport à l'autre. Si ce n'est pas le cas, le deuxième paratope ne pourra pas se lier au deuxième épitope, ou bien de manière non optimale, l'avidité réelle sera donc inférieure à l'avidité maximale théorique. Au final, en fonction de la répétition et de la configuration des épitopes supposés identiques présents à la surface d'un antigène, un anticorps de faible affinité pourra se fixer de manière plus forte à l'antigène qu'un anticorps de forte affinité.

1.5 Résonance plasmonique de surface (SPR)

Historiquement, les constantes d'affinité des complexes Ag-Ac étaient déterminées par la dialyse à l'équilibre. En se basant sur le déplacement de la concentration à l'équilibre d'un antigène radiomarké de part et d'autre d'une membrane semi-perméable, l'utilisation de différentes concentrations en présence d'une concentration connue d'anticorps permettait de déterminer l'affinité par la construction d'une droite de Scatchard. Dans les années 1990, les méthodes de dialyse à l'équilibre ont été remplacées par la SPR qui est une technique plus sensible, plus pratique, ne nécessitant ni marquage des anticorps ni de l'antigène cible, et plus rapide (22).

1.5.1 Principe de la SPR

La SPR repose sur les changements de propriétés de réflexion d'une mince couche d'or sur laquelle, d'un côté une lumière polarisée est dirigée à travers un prisme avant d'être réfléchi vers un photodétecteur, et de l'autre côté un ligand est immobilisé et baigne dans un flux de tampon. La lumière polarisée génère une onde évanescente de surface pénétrant dans la fine couche d'or et sur quelques centaines de nanomètre dans le tampon, où une partie des photons sera absorbée. Le photodétecteur mesure l'intensité de la lumière réfléchi en fonction de l'angle d'incidence, ce qui permet d'observer, à un angle donné, un minimum d'intensité correspondant à l'absorption de l'énergie de l'onde évanescente par les électrons libres de la surface. L'angle auquel se situe ce minimum est appelé angle de résonance et varie en fonction de la masse présente sur la couche d'or, tout changement de masse modifiant alors l'indice de réfraction.

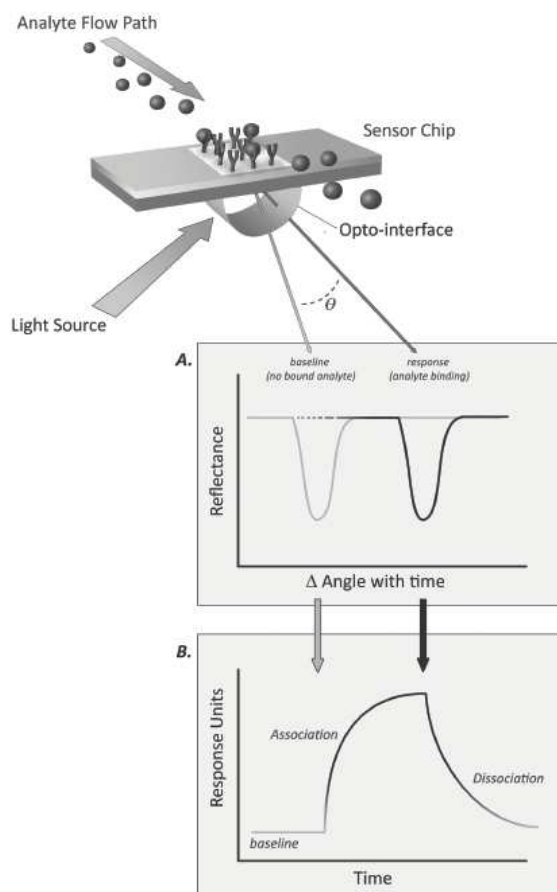


Figure 6 : Principe de la résonance plasmonique de surface

D'après Helmerhorst *et al.* ref [22]

En pratique, la plupart des instruments de SPR utilisent des puces présentant une surface d'analyse, séparée en plusieurs pistes grâce à une cartouche microfluidique, sur laquelle une matrice de polymères est fixée. Celle-ci permet la liaison covalente du ligand, c'est-à-dire son immobilisation, grâce à une chimie de couplage utilisant les groupements amines, thiols, hydroxyles, carboxyles ou aldéhydes. Il est également possible d'utiliser un système non covalent, c'est-à-dire de capture, par exemple en immobilisant un anticorps reconnaissant le ligand d'intérêt, ou bien en immobilisant de la streptavidine ou des conjugués de nickel pour lier un ligand qui aura préalablement été fonctionnalisé avec de la biotine ou une « étiquette » histidine, respectivement.

Une fois le ligand attaché à la surface, une solution contenant l'analyte à étudier est injectée à un flux constant et pendant un temps donné. L'appareil mesure en permanence et en « temps réel » la variation de masse à la surface de la piste. Le signal observé en fonction du temps constitue un sensorgramme dont l'unité est la « *resonance unit* » ou RU, 1 RU correspondant à la fixation d'un ng de protéine par mm². En l'absence d'injection de solution à tester, un tampon de course est passé sur la surface et rien ne se fixe sur le ligand, le sensorgramme ne varie donc pas. Durant l'injection d'un analyte capable de se fixer au ligand, la masse augmente à la surface de la piste et l'angle de résonance varie, ceci est observé sur le sensorgramme par une augmentation des RU et correspond à la phase d'association (Voir Figure 6, partie B). Ainsi il est possible d'étudier en temps réel la capacité d'interaction d'un analyte avec un ligand donné, et même d'évaluer la compétition entre analytes en les injectant de manière successive. A noter que la variation de l'angle de

résonance qui a lieu lorsque l'analyte est fixé à son ligand dépend du rapport des masses entre ces deux derniers. De plus, avant de pouvoir interagir avec le ligand qui est immobilisé dans la matrice de polymère, l'analyte doit diffuser depuis le flux (ou *bulk*) passant au-dessus de cette matrice vers cette matrice selon une constante k_m qui est le coefficient de transport de masse (23).

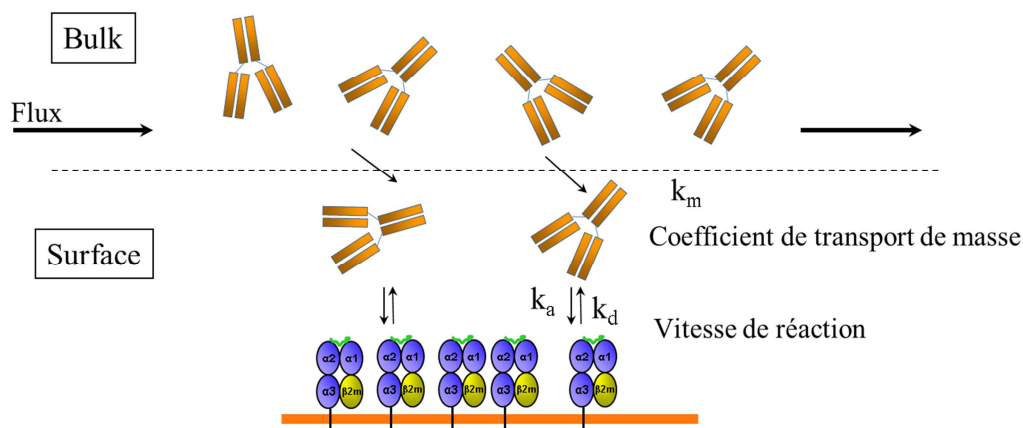


Figure 7 : Transport de masse puis interaction avec le ligand

Le k_m dépend du coefficient de diffusion de l'analyte (D), du flux d'injection (f) et des dimensions de la cellule (h , w et l). Le coefficient de diffusion de l'analyte dépend de sa masse moléculaire et de son coefficient de friction, ainsi que de la viscosité relative de la solution utilisée. La formule du k_m est la suivante :

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

A la fin de l'injection, le tampon de course prend le relais, l'analyte se dissocie et la masse diminue à la surface de la piste. L'angle de résonance varie dans l'autre sens, ceci est observé sur le sensorgramme par une diminution des RU et correspond à la phase de dissociation, plus ou moins rapide selon la stabilité du complexe.

Dans certains cas, notamment pour la plupart des couples Ag-Ac, la vitesse de dissociation du complexe est très lente, ce qui nécessite d'injecter une solution de régénération sur la surface. Elle est souvent constituée d'une solution acide ou basique, d'une solution de force ionique importante ou contenant certains détergents. Cette solution doit dissocier de manière totale et instantanée les complexes analyte-ligand sans, dans la mesure du possible, dégrader le ligand immobilisé. Ceci permet de multiplier les injections sur la surface sans avoir à changer de piste ni ré-immobiliser une quantité identique de ligand.

1.5.2 Détermination de l'affinité d'un complexe par la SPR

Il est possible de déterminer l'affinité d'un complexe analyte-ligand en injectant des concentrations croissantes d'analyte sur la surface en plusieurs cycles d'association – dissociation puis régénération : c'est ce qu'on appelle le *multiple cycle kinetics analysis* (Figure 8, partie B) (24-27). Le nombre de RU augmente avec la concentration jusqu'à atteindre une réponse maximale, le K_D correspondant à la concentration permettant d'atteindre 50% de celle-ci. Les logiciels d'analyse permettent également de réaliser un ajustement ou *fit* des sensorgrammes suivant un modèle d'interaction donné, le plus souvent mole à mole (1:1), et ainsi déterminer le k_a et le k_d qui sont les constantes élémentaires d'association et de dissociation. Ces constantes peuvent être totalement différentes pour deux analytes ayant le même K_D . En effet, ce dernier étant le rapport des deux premiers, un analyte s'associant et se dissociant très rapidement pourra avoir le même K_D qu'un autre s'associant et se dissociant très lentement, ce qui peut avoir des conséquences sur la physiopathologie ou les applications techniques.

Il est également possible d'injecter des concentrations croissantes de l'analyte sans cycle de régénération entre les injections : c'est ce qu'on appelle le *single cycle kinetics analysis* (Figure 8, partie A) (28, 29). De la même manière, l'ajustement des sensorgrammes suivant un modèle d'interaction permettra de déterminer les constantes cinétiques et la constante d'équilibre de la réaction. Il est important de couvrir une plage de concentrations suffisamment large, allant de l'absence d'analyte jusqu'à une concentration permettant d'obtenir la saturation, afin d'obtenir des résultats fiables.

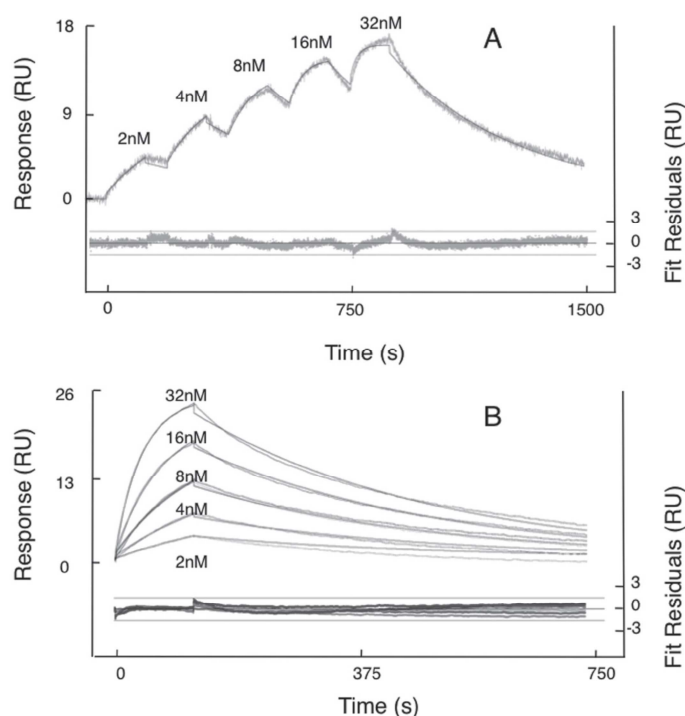


Figure 8 : Analyses cinétiques en mode « single-cycle » (haut) et « multi-cycle » (bas)

D'après Helmerhorst *et al.* ref [22]

Il est important de noter qu'afin de pouvoir réaliser ces analyses il est nécessaire d'avoir au préalable déterminé la concentration précise et active de l'analyte, c'est-à-dire la

concentration de la fraction capable d'interagir avec le ligand, car tous les calculs sont basés sur ce paramètre. Il serait possible d'utiliser la SPR pour déterminer la concentration d'un analyte en utilisant une courbe de calibration, mais ceci nécessite d'avoir un échantillon de référence ayant 100% d'activité, ce qui est rarement le cas (30, 31). Par ailleurs, dans le cadre de l'étude de couples Ag-Ac, la détermination de la concentration de l'anticorps par des techniques spectrophotométriques ou colorimétriques sont grossières car ne s'affranchissent pas des impuretés et ne tiennent pas compte de l'intégrité de l'anticorps après une éventuelle purification.

Par ailleurs, afin de réaliser des études cinétiques fiables, il est impératif de s'affranchir du phénomène de transport de masse, de sorte que l'association entre l'analyte et le ligand ne dépende que des constantes cinétiques du complexe. S'il n'y a pas de limitation par le transport de masse, alors la vitesse observée, k_{obs} , ne dépend que du k_a , du k_d et de la concentration de l'analyte. Ce sont les conditions qui sont recherchées lorsque l'on réalise des études de cinétiques en privilégiant l'immobilisation d'une faible quantité de ligand et l'utilisation d'un flux rapide, en général supérieur ou égal à 25 $\mu\text{l/min}$.

1.5.3 Calibration-free concentration analysis par la SPR

La SPR offre un moyen de déterminer la concentration active d'un analyte, c'est-à-dire la concentration de la fraction d'analyte capable d'interagir avec le ligand, et ce sans courbe de calibration : c'est la *calibration free concentration analysis* ou CFCA (32, 33). Cette technique repose sur le phénomène de limitation de transport de masse décrit précédemment. Si la vitesse de diffusion de l'analyte vers la surface est plus lente que la vitesse d'association à son ligand, la vitesse d'association apparente se trouvera diminuée. Pour un analyte utilisé dans les mêmes conditions de concentration, température et solution, le coefficient de transport de masse ne dépendra alors que de la vitesse d'injection que l'on utilise. On observera alors une pente d'association initiale différente en fonction du flux.

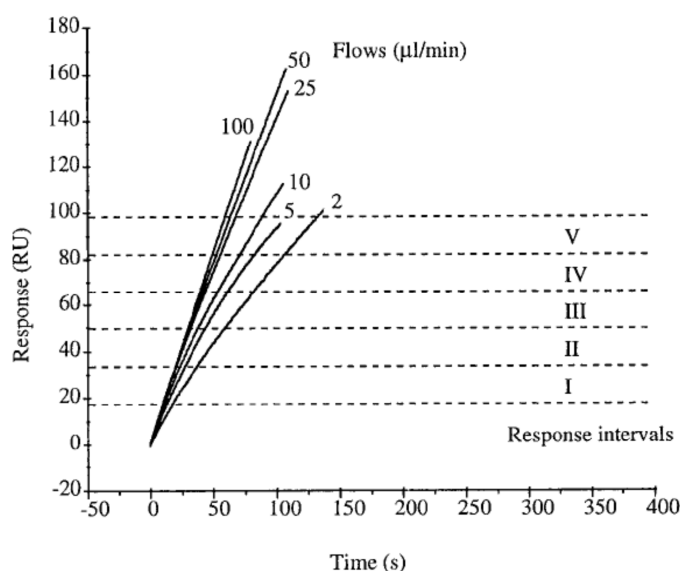


Figure 9 : Limitation de transport de masse et vitesse d'injection

D'après Richalet-Sécordel *et al.* ref [33]

L'utilisation d'un flux lent, d'une grande quantité de ligand immobilisé et d'une concentration en analyte faible favorise la limitation par le transport de masse. L'analyte est alors injecté selon au moins deux flux différents, un lent et un rapide, la comparaison des vitesses d'association en fonction du flux utilisé permettant de calculer la concentration active de l'analyte.

1.5.4 Limites de la SPR

La SPR n'est pas dénuée d'inconvénients et un certain nombre de paramètres sont à maîtriser impérativement si l'on veut obtenir des résultats fiables.

Tout d'abord, en ce qui concerne l'immobilisation du ligand, le couplage chimique peut entraîner un masquage du site de reconnaissance par l'analyte, et donc empêcher l'interaction entre les deux partenaires. Ceci est également valable en mode capture si l'agent de capture reconnaît le même épitope ou un épitope suffisamment proche du site de reconnaissance par l'analyte, avec pour conséquence un phénomène de compétition et encore une fois l'absence d'interaction entre les deux partenaires à étudier.

La régénération est une étape critique car elle doit permettre de dissocier tous les complexes ligand-analyte sans dégrader le ligand. En fonction de la nature de celui-ci, il peut être difficile de trouver la solution de régénération adéquate.

S'il existe une différence entre l'indice de réfraction du tampon de course et de celui de la solution contenant l'analyte, une réponse peut être générée sans qu'il existe une interaction entre l'analyte et le ligand. Ceci peut être corrigé par la soustraction au sensorgramme de la piste où le ligand est immobilisé du sensorgramme d'une piste de référence contrôle sans ligand immobilisé située en amont par rapport au flux d'injection. La correction est encore plus rigoureuse en utilisant le « *double referencing* » (34), c'est-à-dire en ajoutant la soustraction du sensorgramme obtenu lors de l'injection du tampon de dilution seul, et dans les mêmes conditions que celui contenant l'analyte, sur la piste contenant le ligand immobilisé.

Il peut également exister des interactions non spécifiques ou non désirées (NSB ou *non-specific binding*) entre l'analyte, ou des composants de la solution contenant l'analyte, et la surface (35). En effet, la SPR est une technique qui ne nécessite pas de marquage préalable de l'analyte (*label-free*), donc la moindre particule capable d'interagir avec la surface sera détectée. Ceci peut être corrigé par le *double-referencing* à partir du moment où la présence du ligand ne modifie pas le NSB.

Enfin, nous avons vu que les anticorps possédaient deux sites de liaison à l'antigène. Si les deux sites sont capables d'interagir avec le ligand immobilisé à la surface, alors le modèle d'interaction 1:1 n'est pas approprié pour déterminer les constantes d'interaction du complexe Ag-Ac (36-38). Le même raisonnement s'applique pour les échantillons complexes, c'est-à-dire ceux qui contiennent plusieurs analytes capables de se fixer au ligand. Les logiciels d'analyse des données offrent la possibilité d'utiliser des modèles plus complexes afin de s'approcher au plus près de la réalité de la cinétique d'interaction, mais cela nécessite de connaître précisément la composition de la solution injectée ou des ligands immobilisés sur la surface (39, 40).

1.6 Fc, classes d'Ig et fonctions effectrices

Il existe cinq classes d'immunoglobulines : les immunoglobulines G (IgG), IgA, IgM, IgE et IgD, par ordre de concentration sérique décroissant chez le sujet normal. Les IgG sont de plus divisées en quatre sous-classes, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, et les IgA en deux : IgA1 et IgA2. Les différences entre ces classes et sous-classes se situent au niveau de la chaîne lourde, et plus particulièrement au niveau de la partie Fc, ce qui leur confère des poids moléculaires et des fonctions effectrices différents. Les trois fonctions effectrices les plus importantes des anticorps sont l'activation de la voie classique du complément, l'opsonisation et l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

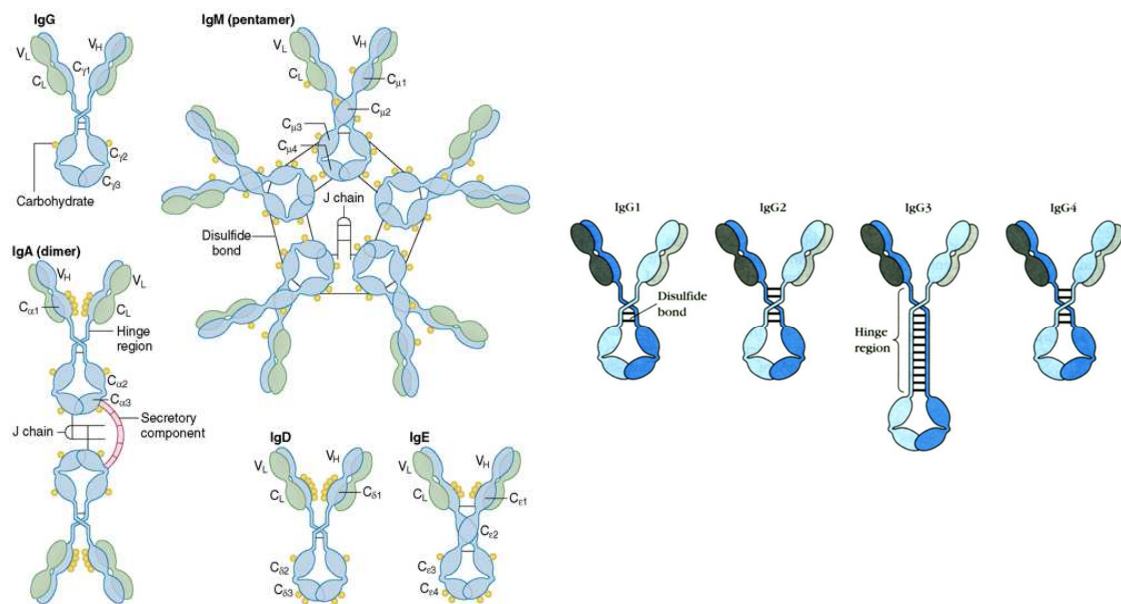


Figure 10 : Classes des immunoglobulines (gauche) et sous-classes d'IgG (droite)

D'après Elsevier's Integrated Immunology and Microbiology, J. Actor et Immunologie, J. Kindt, Editions Dunod

L'opsonisation représente la capacité d'un anticorps, fixé sur son antigène via ses Fab, à interagir via son Fc avec les cellules phagocytaires et ainsi à favoriser l'internalisation de cet antigène. En parallèle, l'ADCC représente la capacité d'un anticorps à interagir avec des cellules capables d'engendrer une lyse cellulaire. Ces deux fonctions dépendent de la capacité du Fc à se lier à des récepteurs spécifiques situés à la surface de nombreux types cellulaires, les FcR et plus particulièrement les FcγR pour les IgG (41). La liaison des IgG au FcγR entraîne l'activation de différentes fonctions, par exemple chez les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, une augmentation des fonctions phagocytaires et de présentation antigénique, et chez les cellules NK le déclenchement des fonctions de toxicité cellulaire. La description du système du complément et de son activation fera l'objet d'un sous-chapitre spécifique.

Les IgG sont les immunoglobulines prépondérantes au niveau sérique, sont sous forme monomérique et ont une chaîne lourde constituée de 3 domaines constants. Elles constituent les seules immunoglobulines capables de traverser la barrière placentaire grâce un mécanisme actif mettant en jeu les récepteurs Fc néonataux (FcRn). Elles possèdent une demi-vie de 3 semaines (plus courte pour les IgG3 qui sont plus sensibles à l'action des protéases) grâce à

ces mêmes FcRn qui sont exprimés chez l'adulte par de nombreux types cellulaires, ce qui permet de les protéger du catabolisme en comparaison aux autres classes. Les IgG1, 2 et 4 ont un poids moléculaire de 146 kDa environ alors que celui des IgG3, possédant une région charnière plus longue, est de 165 kDa (42). Les fonctions effectrices diffèrent en fonction des sous-classes d'IgG : les IgG1 et IgG3 sont connues pour activer la voie classique du complément de manière très efficace (43), à condition qu'au moins deux molécules d'IgG soient suffisamment proches à la surface de leur cible (44). Elles sont également très bien reconnues par les FcR, donc favorisent l'opsonisation et déclenchent l'ADCC. Les IgG2 sont beaucoup moins efficaces pour activer le complément et se lient aux FcR uniquement chez 50% des Caucasiens portant un allèle du FcγRIIA particulier (45). Les IgG4 n'activent pas le complément et sont très peu reconnues par les FcγR. Ces règles strictes dépendent cependant des conditions, il a en effet été démontré que les IgG2 et IgG4 étaient capables d'activer le complément en cas de forte densité antigénique ou de forte concentration en complément (46, 47).

Les IgM sont exprimées sous forme monomérique à la surface des lymphocytes B naïfs où elles constituent le BCR (*B-cell receptor*), et sous forme pentamérique, voire hexamérique, lorsqu'elles sont sécrétées, associant 5 monomères d'Ig reliés entre eux par des ponts disulfures, ainsi qu'une pièce J (pour *joining*) de 15 kDa. Leur chaîne lourde est constituée de 4 domaines constants, le poids moléculaire d'un monomère d'IgM étant alors de 190 kDa et d'un pentamère de 966 kDa. Ce sont les principales immunoglobulines produites par un nouveau-né et sécrétées lors d'une réponse immunitaire primaire. Les IgM sont le principal support des anticorps dits « naturels », c'est-à-dire présents avant tout contact avec l'antigène. Ces anticorps naturels sont habituellement polyspécifiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent reconnaître un assez grand nombre d'épitopes, mais avec une faible affinité. La faible affinité des IgM est compensée par le caractère pentamérique de la forme sécrétée, chacun des 10 ou 12 Fab se liant à l'antigène coopérant avec les autres pour augmenter l'avidité pour l'antigène. Une fois fixée sur sa cible, l'IgM pentamérique change de conformation, ce qui lui permet d'activer la voie classique du complément de manière très efficace.

Les IgA sont présentes dans le sérum sous forme monomérique mais peuvent être également retrouvées sous forme dimérique, trimérique ou tétramérique en association avec une chaîne J. Leur chaîne lourde est constituée de 3 domaines constants, le poids moléculaire d'un monomère d'IgA étant de 160 kDa. Les IgA représentent environ 60% des immunoglobulines synthétisées par l'organisme mais ne sont pas prépondérantes dans le sérum pour différentes raisons : elles sont principalement produites au niveau des muqueuses et des glandes exocrines et sont plus sensibles au catabolisme que les IgG. Les IgA sécrétoires, qui comprennent environ 50% d'IgA1 et d'IgA2, sont principalement constituées d'un dimère d'IgA et de leur chaîne J auxquelles s'associe une autre protéine, la pièce sécrétoire. Les IgA sécrétoires constituent une défense clé contre les organismes étrangers qui pénètrent au niveau des muqueuses.

Les IgE sont monomériques et retrouvées à de très faibles concentrations dans le sérum. Leur chaîne lourde est constituée de 4 domaines constants et leur poids moléculaire est de 188 kDa. Elles sont impliquées dans la réponse anti-parasitaire, notamment via l'activation des polynucléaires éosinophiles. Elles sont d'autre part responsables de l'hypersensibilité immédiate ou anaphylaxie qui constitue une réponse inappropriée à un antigène non « dangereux » ou allergène. Celle-ci est médiée par le pontage de deux IgE fixées sur les

FcεRI exprimés par les mastocytes, générant alors une dégranulation rapide et massive de ceux-ci.

Enfin, les IgD sont monomériques, principalement retrouvées à la surface des lymphocytes B naïfs et seraient impliquées dans le contrôle de leur activation. Leur chaîne lourde est constituée de 3 domaines constants et leur poids moléculaire est de 184 kDa.

Propriété/Activité	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE	IgD
Poids moléculaire (kDa)	190/966	146	146	165	146	160/406	188	184
Concentration sérique (mg/ml)	0,55-3,5	4-10	0,6-6	0,18- 0,8	0-1,6	1-3,8	traces	0,02-0,05
Demi-vie sérique (jours)	5	23	23	8	23	6	2,5	3
Activation du complément	++++	+++	+	++++	-	-	-	-
Opsonisation	+	+++	++	++	+	+	-	-
ADCC	-	+++	++	+++	-	-	-	-
Transport placentaire	-	++++	+	+++	+/-	-	-	-

Tableau 1 : Particularités des classes et sous-classes d'immunoglobulines

Par opposition au gène de la région variable qui, une fois réarrangé, est caractéristique d'un clone lymphocytaire, des régions constantes différentes peuvent être associées successivement à une même région variable au sein d'un même clone. C'est ce que l'on appelle le phénomène de commutation isotypique (48). En effet, les lymphocytes B naïfs produisent des IgD et IgM qui, exprimées à leur surface, font partie du récepteur à l'antigène ou BCR. Ceci est dû au fait que les gènes codant Cμ et Cδ sont situés immédiatement en 3' des gènes V, D et J. En aval de Cμ et Cδ se trouvent les gènes codant pour les autres classes d'immunoglobulines.



Figure 11 : Organisation des gènes codant les régions constantes des chaînes lourdes

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

La production d'un isotype autre que mu ou delta n'est possible que successivement à la reconnaissance par le lymphocyte B naïf de son antigène puis de sa coopération avec les lymphocytes T au niveau des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. A noter que les cytokines produites par les lymphocytes T ont une influence sur le type de nouvelle chaîne lourde qui sera produite par le lymphocyte B. La commutation isotypique met en jeu un processus de recombinaison somatique irréversible semblable à celui des gènes V, D et J grâce à l'AID. Elle conduit à une perte du matériel génétique situé entre le gène de la partie variable et la nouvelle classe produite par le lymphocyte B, c'est-à-dire au minimum les

gènes $C\mu$ et $C\delta$. Tant qu'il reste des gènes codant pour des fragments constants en aval de celui qui est exprimé, une nouvelle commutation isotypique est possible.

1.7 Système du complément

Le système du complément est apparu très tôt au cours de l'évolution. Chez l'homme, près de 35 protéines participent à son fonctionnement. Certaines sont solubles, d'autres membranaires, qu'elles soient activatrices ou régulatrices. Le système du complément est divisé en trois voies qui diffèrent par leur mode d'activation mais conduisent à une voie terminale commune. On distingue la voie classique, la voie alterne, et la voie des lectines (49). Cette dernière ne sera pas développée dans le manuscrit et la voie alterne ne sera décrite qu'en tant que voie activée secondairement à la voie classique, même si elle possède un fonctionnement autonome.

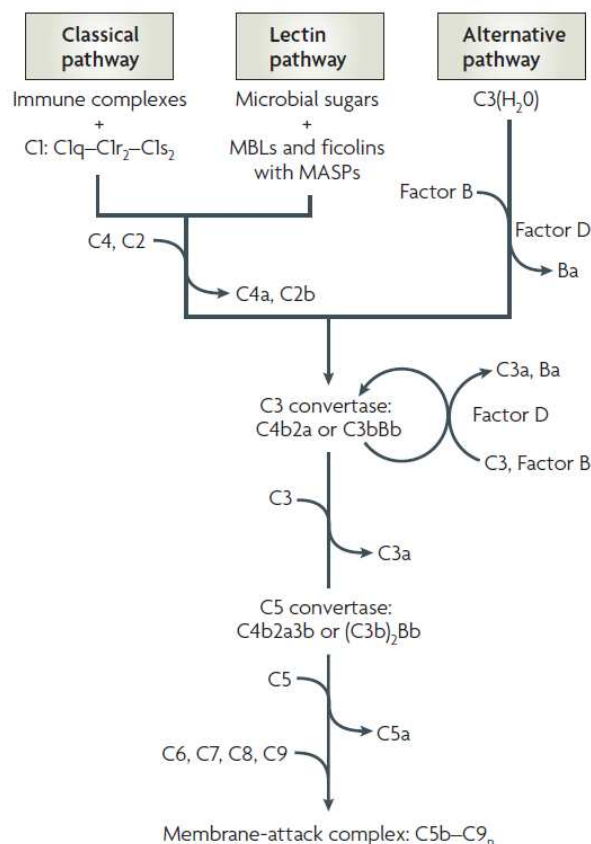


Figure 12 : Les trois voies du complément

D'après Gros P. *et al.* ref [49]

La voie classique est principalement activée par les IgG1, IgG3 et IgM. Au moins deux molécules d'IgG suffisamment proches, ou un pentamère d'IgM, fixés sur leur cible sont capable de recruter le complexe C1 (44, 50). Celui-ci est soluble, constitué de la protéine hexamérique C1q (410 kDa) associée de manière dépendante du calcium à un tétramère constitué de 2 molécules de C1r (92 kDa) et de 2 molécules de C1s (86 kDa). Le C1q confère la capacité de liaison aux Fc des anticorps, alors que l'association C1r et C1s possède l'activité enzymatique permettant de cliver d'autres facteurs solubles, les C4 et C2, en C4a/C4b et C2a/C2b, respectivement. Il faut noter que la nomenclature impose que le plus

gros fragment provenant du clivage d'un facteur CX du complément s'appelle CXb. Dans le cas du C2, historiquement, C2a et C2b ont été inversés. Nous conserverons cette erreur dans ce mémoire pour une meilleure compréhension lors de la lecture des figures. Le fragment C4b est capable de se lier de manière covalente à d'autres protéines ou sucres par une réaction de transacylation impliquant un groupement thioester. Il devient ainsi un accepteur pour le C2a, en présence de magnésium, pour devenir la C3 convertase classique ou C4b2a. A noter que le C4b est très sensible à l'hydrolyse et ne peut se fixer qu'à proximité de l'endroit de sa génération, c'est-à-dire sur les anticorps eux-mêmes, sur le complexe C1 ou sur l'antigène. La fixation d'une molécule de C1 engendre la production et la fixation de plusieurs molécules de C4b et donc de plusieurs C3 convertases classiques (51). La C3 convertase classique est à son tour capable de cliver plusieurs exemplaires du facteur soluble C3 en C3a et C3b. Le C3b possède la même capacité de liaison covalente et la même sensibilité à l'hydrolyse que le C4b. En s'associant au C4b2a, il forme le C4b2a3b ou C5 convertase classique. Le C3b formé peut également recruter le facteur B de la voie alterne pour former la C3 convertase alterne (C3bBb), capable de cliver encore plus de C3 (52). La production de C3b secondaire à l'activation de la voie classique bénéficie alors d'une boucle d'amplification supplémentaire en comparaison au C4. La C3 convertase alterne peut également recruter du C3b pour former le C3BbC3b ou C5 convertase alterne. La formation des C5 convertases classique ou alterne marque le début de la voie terminale commune, consistant en le clivage du facteur soluble C5 en C5a et C5b, le C5b interagissant ensuite avec le facteur C6 puis C7 pour former le complexe C5b7, hydrophobe et capable de s'insérer dans les membranes cellulaires puis de capter le facteur C8 pour former le complexe C5b8 qui sert de récepteur au facteur C9. La fixation de la première molécule de C9 induit l'incorporation de plusieurs autres molécules de C9 (6 à 12) qui formeront alors un canal transmembranaire, appelé complexe d'attaque membranaire (CAM), responsable d'une lyse cellulaire osmotique.

La formation du CAM et ses conséquences constituent le rôle le mieux retenu du système du complément, mais il en existe d'autres aussi importants, sinon plus. Tout d'abord, les C3a et C5a sont des anaphylatoxines qui permettent le recrutement des cellules immunitaires au niveau du foyer de l'activation du complément. En effet, le C5a est un puissant activateur des granulocytes, il induit la libération de leurs granules sécrétoires contenant un grand nombre de médiateurs inflammatoires et augmentent leur activité oxydante. En agissant sur les cellules endothéliales, il augmente la perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhésion. Les C3 et C5 convertases ont une durée de vie courte afin d'éviter la propagation de l'activation aux cellules environnantes. Leur dissociation implique un certain nombre de molécules régulatrices membranaires et solubles telles que la C4bp (*C4b binding protein*) et le facteur I qui inactivent le C4b et le C3b, respectivement, par clivage protéolytique. Ceci conduit à la formation de diverses formes intermédiaires de molécules de C4b et C3b inactivées mais toujours liées à la surface de la cible, comme le C4d, le C3bi et le C3d(g). Le C3b, C3bi et C3d(g) sont reconnaissables par les récepteurs au complément CR1 et CR3, portés par les cellules phagocytaires, et favorisent ainsi leur adhésion à la cible. Le C3d est également reconnu par le CR2 qui est exprimé par les lymphocytes B, ce qui abaisserait leur seuil d'activation en présence de l'antigène. Les CR1, CR2 et CR3 sont également exprimés par les cellules dendritiques folliculaires, ce qui leur permet de capter l'antigène et de le retenir plus longtemps à leur surface afin de jouer leur rôle majeurs dans les processus de maturation d'affinité des lymphocytes B lors de la réponse secondaire à l'antigène. Enfin, le complément prévient le dépôt, au niveau des endothéliums, des complexes immuns via la reconnaissance du C3b par le CR1 qui est exprimé par les hématies. Celles-ci seront ensuite prises en charge par les macrophages tissulaires CR3+ du système réticulo-endothélial où l'élimination des complexes immuns sera achevée.

2 SYSTEME HLA (HUMAN LEUCOCYTE ANTIGENS)

2.1 Structure des molécules HLA

Les molécules HLA sont des glycoprotéines hétérotrimériques transmembranaires exprimées à la surface cellulaire. Elles sont codées par des gènes situés dans le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Le CMH est un ensemble de gènes retrouvé chez toutes les espèces de vertébrés. Initialement décrit chez la souris (53), il a ensuite été mis en lien avec le rejet de greffe (54) puis le CMH humain a été décrit par Jean Dausset dans les années 1950 (55). Le CMH humain est localisé sur le bras court du chromosome 6 et comprend deux ensembles de gènes ou régions codant pour les molécules HLA, régions I et II, encadrant une troisième région (région III) comprenant un ensemble de gènes codant, notamment, pour un certain nombre de molécules de régulation de l'immunité.

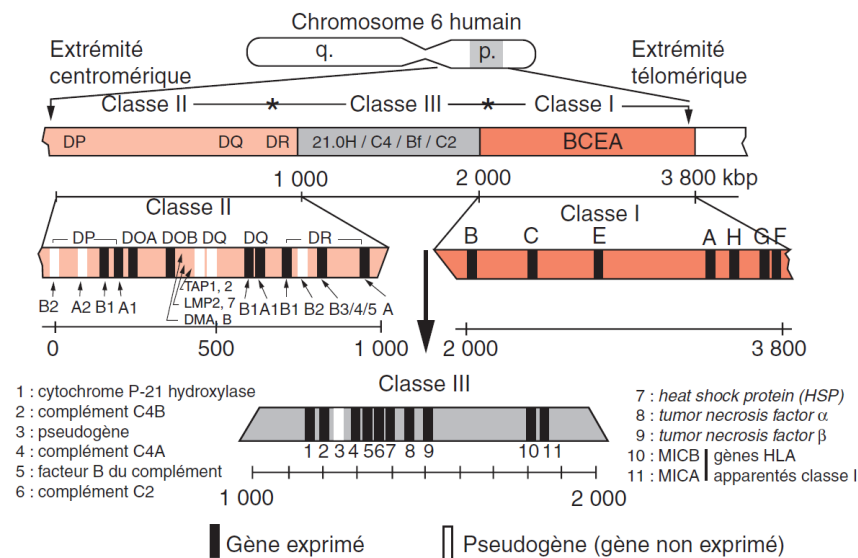


Figure 13 : Complexe majeur d'histocompatibilité humain

D'après Cesbron-Gautier A. *et al.* Encyclopédie médico-chirurgicale 2008

Les molécules HLA de classe I associent une chaîne lourde codée dans la région I du CMH, d'un poids approximatif de 44 kDa, à une chaîne légère, la β 2-microglobuline (12 kDa) (B2M), et à un peptide. Ces trois éléments sont liés de manière non covalente. La chaîne lourde est organisée en trois domaines extracellulaires (α 1, α 2 et α 3) reliés à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire hydrophobe suivi d'une courte séquence intracellulaire.

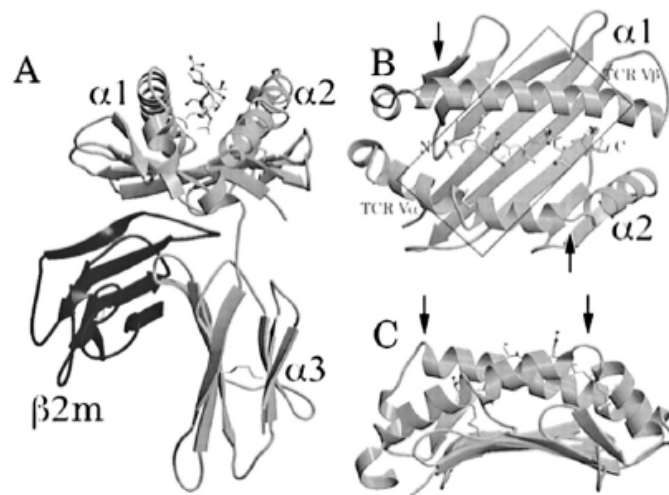


Figure 14 : Structure d'une molécule HLA de classe I

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Les molécules HLA de classe II associent deux chaînes codées dans la région II du CMH, α et β d'un poids moléculaire de l'ordre de 34 et 29 kDa respectivement, et un peptide. Ces deux chaînes sont organisées en deux domaines extracellulaires, $\alpha1/\alpha2$ et $\beta1/\beta2$, les domaines $\alpha1$ et $\beta1$ étant les plus éloignés de la membrane plasmique.

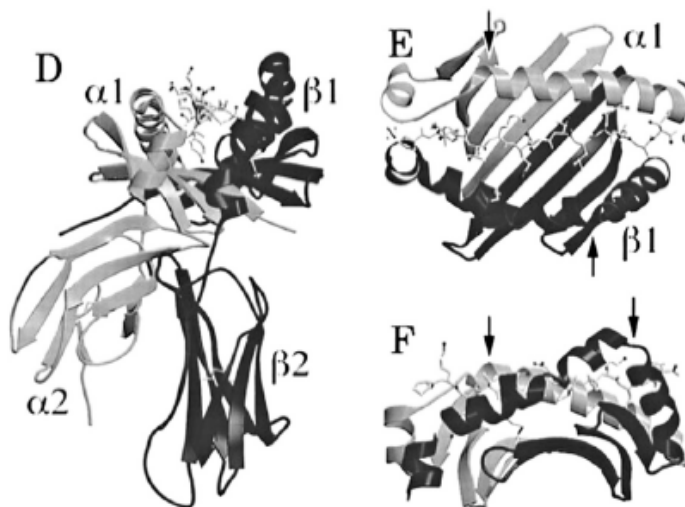


Figure 15 : Structure d'une molécule HLA de classe II

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Les molécules HLA de classe I et II ont une remarquable similarité structurale, particulièrement au niveau de la région servant à la présentation des peptides aux lymphocytes T. Pour les molécules HLA de classe I, les domaines $\alpha1$ et $\alpha2$ forment deux hélices α parallèles encadrant un feuillet plissé β , l'ensemble formant une « poche » dans laquelle le peptide antigénique est maintenu en position grâce à certains résidus d'acides aminés jouant le rôle d'ancres. Les molécules HLA de classe II forment une poche similaire constituée des domaines $\alpha1$ et $\beta1$ des chaînes α et β . La différence entre les molécules HLA de classe I et II réside dans les extrémités de la poche, celle-ci étant fermée aux deux extrémités pour la classe

I et permettant de fixer de manière préférentielle des peptides de 8-10 acides aminés, alors que pour les molécules HLA de classe II les extrémités sont plus ouvertes, permettant la fixation préférentielle de peptides de 10-13 acides aminés.

2.2 Polymorphisme des molécules HLA

Les gènes codant pour les molécules HLA de classe I et II sont les plus polymorphes du génome humain, avec plus de 13 000 allèles décrits en Octobre 2015. Ce polymorphisme suggère que le CMH humain a été soumis à une pression évolutive intense et un taux de mutation supérieur à n'importe quelle autre région du génome (56, 57). Il est le résultat de mutations ponctuelles, mais également de conversions géniques et de recombinaisons homologues ayant eu lieu au moment de la méiose. C'est pour cela que les différents allèles HLA sont très proches entre eux au sein d'un même locus, mais également entre plusieurs loci de la même classe, et que l'on dit que les molécules HLA sont des mosaïques de déterminants antigéniques.

Les gènes codant pour la chaîne lourde des molécules HLA de classe I classiques sont au nombre de trois et codent pour HLA-A, -B et -C qui sont toutes très polymorphes. Les gènes codant pour les molécules HLA de classe II classiques sont au nombre de neuf : HLA-DRA1, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 et -DPB1. Les gènes DRB3, DRB4 et DRB5 ne sont pas présents chez tous les individus et sont associés à des allèles DRB1 particuliers.

Les gènes codant pour les chaînes β des molécules HLA-DR, -DQ et -DP sont beaucoup plus polymorphes que ceux codant pour les chaînes α , la chaîne α du DR étant notamment presque monomorphe. Il est important de noter que tous les polymorphismes ne se situent pas au sein des régions codantes, et que certains polymorphismes situés dans les régions codantes n'engendrent pas un changement de la séquence peptidique (mutations silencieuses). Il existe donc un nombre bien plus faible de protéines HLA que d'allèles HLA.

Gène	Nombre		
	Allèles	Protéines	Allèles nuls
HLA-A	3285	2313	153
HLA-B	4077	3011	128
HLA-C	2801	1985	93
HLA-DRA	7	2	0
HLA-DRB1	1825	1334	41
HLA-DRB3	60	48	1
HLA-DRB4	17	10	3
HLA-DRB5	22	19	2
HLA-DQA1	54	32	1
HLA-DQB1	876	595	22
HLA-DPA1	42	21	0
HLA-DPB1	587	480	15

Tableau 2 : Allèles et protéines HLA

D'après <http://hla.alleles.org>, mise à jour en Octobre 2015

Les positions d'acides aminés polymorphes sont plus particulièrement situées au sein des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules HLA de classe I, des domaines $\beta 1$ des molécules HLA-

DR, et $\alpha 1$ et $\beta 1$ des molécules HLA DQ et DP. La plupart d'entre elles ne sont pas accessibles à la surface de la molécule HLA car sont situées dans la zone constituant la poche à peptide où elles jouent un rôle dans la modulation du répertoire des peptides présentable par une molécule HLA donnée.

Néanmoins, un certain nombre des positions situées au niveau des hélices α des molécules HLA de classe I et II sont accessibles à la surface de la molécule. Un certain nombre d'autres positions situées à la surface du domaine $\alpha 3$ en classe I, $\beta 2 \pm \alpha 2$ en classe II s'y associent pour constituer des sites de variations reconnaissables par des anticorps. Ce sont ces particularités qui ont permis à Jean Dausset de découvrir les molécules HLA par leucoagglutination dans les années 1950, puis le typage HLA par les techniques sérologiques qui sont encore utilisées de nos jours. Ces dernières sont beaucoup moins résolutive que les techniques de biologie moléculaire de l'ADN, ce qui explique que seulement quelques dizaines d'antigènes HLA soient définis.

Séries de classe I				Séries de classe II		
A	B	Cw	DR	DQ	DP	
A1	B5	B49(21)	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B54(22)	Cw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	DR9		
A24(9)	B18	B57(17)		DR10		
A2403	B21	B58(17)		DR11(5)		
A25(10)	B22	B59		DR12(5)		
A26(10)	B27	B60(40)		DR13(6)		
A28	B2708	B61(40)		DR14(6)		
A29(19)	B35	B62(15)		DR1403		
A30(19)	B37	B63(15)		DR1404		
A31(19)	B38(16)	B64(14)		DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B65(14)		DR16(2)		
A33(19)	B3901	B67		DR17(3)		
A34(10)	B3902	B70		DR18(3)		
A36	B40	B71(70)		DR51		
A43	B4005	B72(70)		DR52		
A66(10)	B41	B73		DR53		
A68(28)	B42	B75(15)				
A69(28)	B44(12)	B76(15)				
A74(19)	B45(12)	B77(15)				
A80	B46	B78				
	B47	B81				
	B48	Bw4				
		Bw6				

Tableau 3 : Nomenclature HLA en sérologie : les antigènes HLA

D'après Cesbron-Gautier A. *et al.* Gautier A. *et al.* Encyclopédie médico-chirurgicale 2008

Il est important de noter que pour différentes raisons (effet fondateur, sélection naturelle lors de pandémies...), tous les allèles, protéines, antigènes et même haplotypes HLA ne sont pas retrouvés à la même fréquence dans une population donnée. Ainsi, au sein de la population caucasienne, le HLA-A2 est largement surreprésenté alors que l'on ne rencontre que très rarement, par exemple, le HLA-A74.

A	EUR_freq	EUR_rank	AFA_freq	AFA_rank	API_freq	API_rank	HIS_freq	HIS_rank
0201g	0,29604	1	0,12458	1	0,09458	3	0,19403	1
0101g	0,17181	2	0,04742	8	0,05082	5	0,06702	4
0301g	0,14347	3	0,08132	3	0,02597	11	0,07907	3
2402g	0,08686	4	0,02205	15	0,18238	1	0,12324	2
1101g	0,05642	5	0,01581	18	0,17899	2	0,04618	7
2902	0,03279	6	0,03640	12	0,00141	30	0,04167	8

DRB1	EUR_freq	EUR_rank	AFA_freq	AFA_rank	API_freq	API_rank	HIS_freq	HIS_rank
1501	0,14441	1	0,02931	14	0,07919	4	0,06678	4
0701	0,13767	2	0,09771	2	0,08201	2	0,10455	1
0301	0,12916	3	0,07069	4	0,05373	7	0,07329	2
0101	0,09149	4	0,02599	15	0,02743	14	0,03877	9
0401	0,09111	5	0,02287	16	0,00905	22	0,01451	22
1301	0,06283	6	0,05551	7	0,02376	16	0,04202	7

Tableau 4 : Exemple de fréquences d'allèles HLA-A et HLA-DRB1 au sein de différentes populations

EUR = population caucasienne, AFA = population africaine, API = population asiatique, HIS = population hispanique

D'après <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/HLA-Resources/Haplotype-Frequencies>

2.3 Expression des molécules HLA

Les gènes codant pour les molécules HLA sont hérités « en bloc » selon un mode mendélien co-dominant, un individu exprimant alors les allèles en provenance des haplotypes transmis par sa mère et son père. Dans de rares cas, un cross-over méiotique ou un événement de recombinaison peut avoir lieu et modifier l'haplotype parental. Ajouté au polymorphisme des molécules HLA, ce mode de transmission et d'expression implique que la plupart des individus sont hétérozygotes pour la plupart des gènes HLA, et qu'une cellule en provenance d'un individu donné pourra exprimer de 6 à plus de 12 protéines HLA différentes à sa surface.

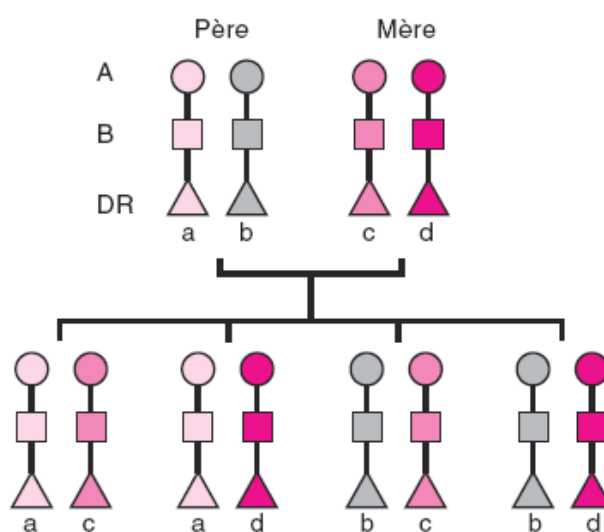


Figure 16 : Transmission parentale des haplotypes HLA

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Les molécules de classe I sont exprimées sur la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme alors que les molécules de classe II sont principalement exprimées par les cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène : les cellules dendritiques, mais aussi les lymphocytes B et les macrophages. D'autres types cellulaires sont capables de présenter des peptides via les molécules de classe II, notamment les cellules endothéliales et épithéliales, et ce de manière plus importante dans un contexte inflammatoire, particulièrement en présence d'interféron gamma (58-61). A l'opposé, les molécules HLA, de classe I notamment, peuvent être sous-exprimées dans certains contextes, en particulier dans le cadre d'une infection à CMV ou pour certaines cellules tumorales (62, 63). Ce mécanisme permet l'échappement de cellules infectées/transformées à l'action des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques.

Par ailleurs, il a été décrit que les molécules HLA-A, -B et -C pouvaient être exprimées en quantités différentes à la surface des cellules (64, 65). Ceci est beaucoup moins bien connu pour les molécules HLA de classe II, la plupart des études s'étant intéressées à HLA-DR uniquement.

2.4 Fonction des molécules HLA

La principale fonction des molécules HLA est de présenter les antigènes protéiques sous forme de peptides aux lymphocytes T pour déclencher la réponse immunitaire spécifique de l'antigène dans ses phases effectrices et régulatrices. La molécule HLA de classe I présente de manière préférentielle des peptides venant de protéines intracellulaires, c'est-à-dire dérivant des protéines produites de façon normale par la cellule mais aussi de protéines virales ou tumorales. Ces complexes HLA-peptide sont analysés par les lymphocytes T CD8+ qui mettront en jeu des processus de cytotoxicité et de sécrétion cytokiniques afin de détruire les cellules infectées ou transformées.

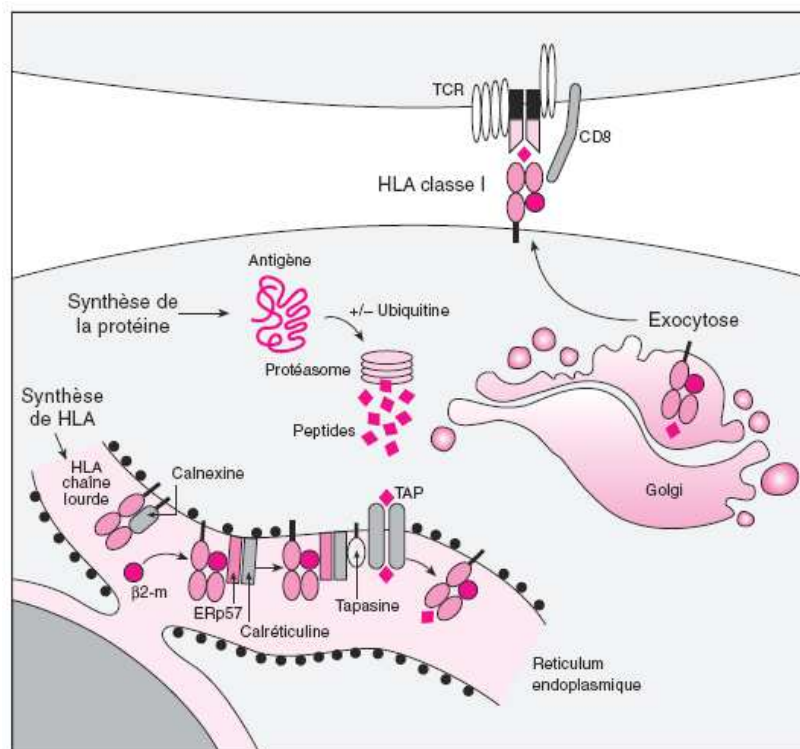


Figure 17 : Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe I
D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Les molécules HLA de classe I, en particulier les HLA-C, peuvent également être reconnues par certains récepteurs inhibiteurs des lymphocytes Natural Killers (NK) comme les « killer cell immunoglobulin-like receptors » (KIRs) ou le NKG2A (66, 67). Ce mode de reconnaissance aurait un rôle important au cours des réponses immunitaires dirigées contre le CMV ou les tumeurs, situations où l'on observe une diminution de l'expression des molécules HLA de classe I.

La molécule HLA de classe II présente de manière préférentielle des peptides venant de protéines extracellulaires, c'est-à-dire dérivant des protéines internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces complexes HLA-peptide seront ensuite analysés par les lymphocytes T CD4+ qui ont un rôle central dans le développement des réponses immunitaires via la production de différentes cytokines qui orienteront le type de réponse mise en place.

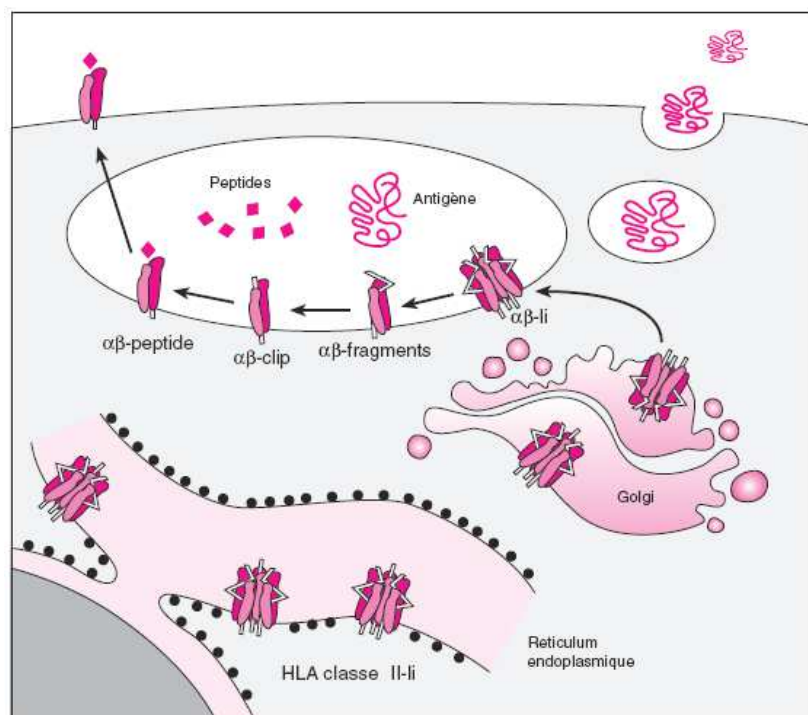


Figure 18 : Présentation de l'antigène par les molécules HLA de classe II
D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

2.5 Molécules HLA en transplantation d'organe

Il est clairement démontré qu'un meilleur appariement HLA du donneur et du receveur a une influence bénéfique sur les résultats des transplantations d'organe (68, 69). Cependant, en raison du grand polymorphisme des molécules HLA et de leur expression co-dominante, la grande majorité des receveurs d'organe sont transplantés en situation de *mismatch* ou non identité HLA. Un grand nombre de lymphocytes T est capable de reconnaître les différences entre donneur et receveur, on les appelle « lymphocytes T alloréactifs ».

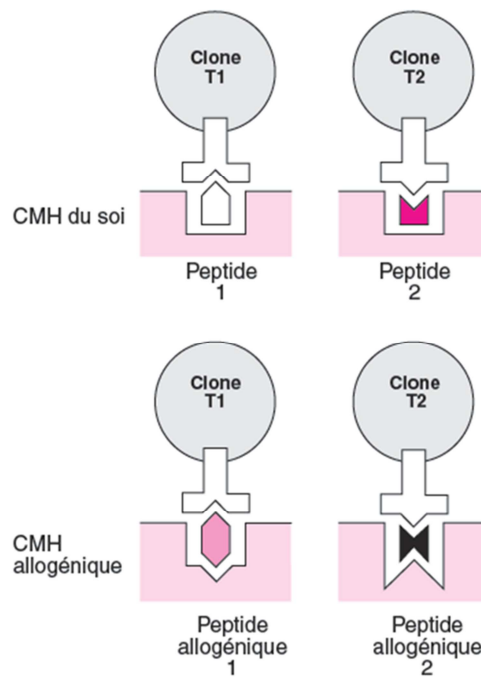


Figure 19 : Allo-reconnaissance par les lymphocytes T

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

Cette allo-reconnaissance peut s'exercer principalement de deux façons : directe, via l'identification des différences de répertoire peptidique présenté par l'organe transplanté, et indirecte, c'est-à-dire après internalisation des molécules HLA étrangères par les cellules immunitaires du receveur, puis clivage sous forme de peptides et présentation par les molécules HLA autologues.

La reconnaissance directe a principalement été mise en lien avec le rejet aigu cellulaire précoce de l'organe transplanté. Les lymphocytes T alloréactifs directs constituent entre 1 et 10% des lymphocytes circulants, alors que seulement 1 lymphocyte T sur 100 000 est capable de reconnaître un peptide donné présenté par le HLA autologue. Le rejet aigu cellulaire est maintenant bien maîtrisé par l'utilisation des molécules immunosuppressives ciblant l'activation et la prolifération des lymphocytes T alloréactifs.

La reconnaissance indirecte est indispensable à la production d'anticorps anti-HLA. En effet, les lymphocytes B capables de reconnaître les molécules HLA étrangères doivent les internaliser, les cliver puis les présenter sous forme de peptides aux lymphocytes T CD4+ présents au niveau des centres germinatifs. Ceux-ci sont principalement les lymphocytes T folliculaires (Tfh) qui permettent de parfaire l'activation des lymphocytes B et ainsi générer une réponse humorale efficace et durable (70). Les mécanismes de production et de maintenance des anticorps anti-HLA seront décrits dans le chapitre suivant.

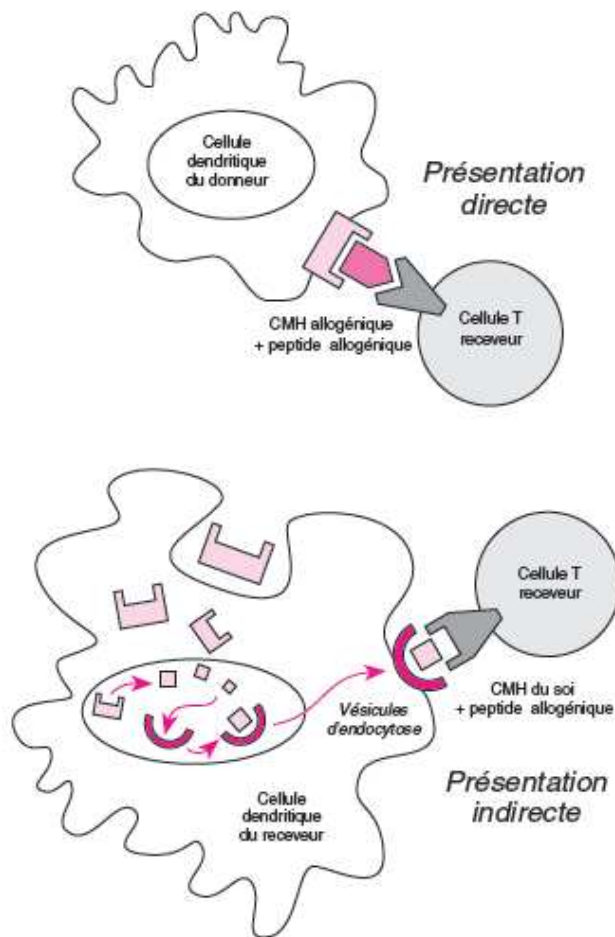


Figure 20 : Allo-reconnaissance directe et indirecte

D'après « Immunologie » 5ème édition, L. Chatenoud et JF. Bach. Médecine-Sciences Flammarion

3 ANTICORPS ANTI-HLA

3.1 Anticorps anti-HLA : épitopes reconnus

Comme nous l'avons vu précédemment, le polymorphisme du système HLA implique que les antigènes HLA exposent des résidus différents au niveau de certaines positions d'acides aminés accessibles à leur surface. Ces sites de variabilité constituent la cible des anticorps anti-HLA et nous devons insister sur deux notions très importantes.

Tout d'abord la notion de différence : pour être immunogénique, un antigène HLA du donneur devra comporter au moins un résidu amino-acide non porté par les molécules HLA du receveur, permettant la formation d'une structure épitopique suffisamment différente de celles rencontrées par les lymphocytes B du receveur lors de la sélection négative ayant lieu dans la moelle osseuse.

Deuxièmement la notion d'accessibilité à la surface de la molécule HLA : un anticorps étant environ trois fois plus volumineux qu'une molécule HLA (71), celui-ci ne pourra en effet reconnaître que les acides aminés exposés à la surface de la molécule et donc capables d'entrer en contact avec les régions CDR qui déterminent la spécificité de l'anticorps, à l'opposé de ceux situés au sein de la poche à peptide, par exemple. Néanmoins, une étude a montré que les peptides présentés pouvaient moduler l'affinité des anticorps anti-HLA (71, 72).

Du fait du mode de génération du polymorphisme des gènes HLA, la plupart des épitopes des molécules HLA sont partagés entre un plus ou moins grand nombre d'entre elles. Ceci explique pourquoi l'immunisation vis-à-vis d'un antigène HLA donné peut conduire à la synthèse d'anticorps réactifs vis-à-vis d'autres antigènes que le receveur n'aura pas rencontrés. Les premiers travaux ayant permis de définir la notion d'épitopes partagés (ou publics) étaient ceux de Rodey et Fuller utilisant les techniques de microlymphocytotoxicité (LCT) (développées plus tard dans ce document) afin de définir des groupes de réactivité croisée (CREG pour *cross-reactive groups*) sur la base de leurs réactivités sérologiques (73-75).

Ensuite, les études cristallographiques puis la modélisation tridimensionnelle des molécules HLA ont permis de localiser les positions polymorphes accessibles aux anticorps anti-HLA pour les molécules HLA de classe I et II. Au début des années 2000, l'équipe de Duquesnoy RJ a proposé un algorithme théorique, nommé HLAMatchmaker, basé sur la comparaison de la séquence en acides aminés des différentes molécules HLA les plus fréquentes. Celui-ci permet d'évaluer le nombre de différences entre donneur et receveur en termes de positions polymorphes pouvant entraîner la formation d'anticorps anti-HLA, ce dans le but d'analyser le degré de compatibilité entre un donneur d'organe et un receveur et ainsi améliorer l'allocation des organes.

Dans sa version initiale, HLAMatchmaker voyait chaque molécule HLA comme une succession de séquences linéaires de trois acides aminés, ou triplets, présents à la surface des molécules HLA (76). HLAMatchmaker a ensuite été amélioré par l'inclusion de séquences plus longues et surtout par des associations d'acides aminés discontinues, un épitope n'étant

en effet pas nécessairement séquentiel. Le terme de triplet a alors été remplacé par celui d'« eplets » (77).

Un total de 199 eplets a été défini pour les molécules HLA de classe I, dont 110 au niveau des hélices alpha, et donc situés sur le dessus de la molécule, 60 sur les faces latérales et 29 à des positions moins accessibles (au fond ou en dessous du sillon peptidique). Pour les molécules HLA de classe II, 146 eplets DR, 74 eplets DQB1, 58 eplets DQA1, 45 eplets DPB1 et 19 eplets DPA1 ont été définis. Les eplets correspondraient aux épitopes fonctionnels décrits plus tôt dans le manuscrit, comprenant 2 à 5 résidus impliqués dans des interactions hautement énergétiques avec le paratope des anticorps anti-HLA, en particulier le CDR3 de la chaîne lourde, et seraient ainsi les principaux résidus responsables de la spécificité de liaison et de la modulation de son affinité. Cependant, étant donné la taille de la surface de contact entre le paratope et l'épitope, taille qui dépasse largement le périmètre d'un eplet, il apparaît que d'autres acides aminés pourront moduler l'affinité, qu'ils soient présents sur les molécules HLA du receveur ou non (78). En effet, les anticorps anti-HLA pourraient dériver de clones B possédant une forte composante auto-réactive et une proximité, voire identité, structurale minimale entre le donneur et le receveur serait nécessaire à la génération de la réponse allogénique humorale (79).

Dans son application clinique d'allocation d'un organe à un receveur, HLAMatchmaker détermine quels eplets sont partagés ou différents entre les molécules HLA d'un donneur et d'un receveur. Ainsi, un donneur pourra apporter un nombre variable d'eplets à deux receveurs de typages HLA différents, défini comme la « charge épitopique » qui serait liée au risque immunologique d'une transplantation. Il est important de noter que le nombre d'éplets apportés par le donneur n'est pas forcément corrélé au nombre de différences en termes d'antigènes HLA, ceci dépendra de la proximité en séquence et en structure spatiale entre les antigènes du donneur et du receveur (80).

Examples of how structurally based compatibility of a mismatched HLA antigen depends on the HLA phenotype of the recipient												
Case	Phenotype						#Ep	B51 (B*5101), mismatched eplets	#Ep	B27 (B*2705), mismatched eplets	#Ep	B61 (B*4002), mismatched eplets
1	A*0101	A*0201	B*1402	B*0702	Cw*0701	Cw*0702	7	11AMR, 44RTE, 76ERI, 82ALR, 113HN, 163L, 193PV	5	9H, 70AKA, 76ERT, 82LLR, 151RV	5	9H, 41T, 44RKE, 113HN, 151RV
2	A*0101	A*0201	B*0702	B*0801	Cw*0701	Cw*0702	6	44RTE, 76ERI, 82ALR, 131S, 163L, 193PV	5	9H, 70AKA, 76ERT, 82LLR, 131S	3	9H, 41T, 44RKE
3	A*0101	A*0201	B*0702	B*4501	Cw*0701	Cw*0702	5	44RTE, 76ERI, 82ALR, 113HN, 193PV	3	70AKA, 76ERT, 82LLR	1	113HN
4	A*0101	A*2501	B*0702	B*0801	Cw*0701	Cw*0702	4	44RTE, 131S, 163L, 193PV	7	9H, 70AKA, 73TD, 76ERT, 82LLR, 113YH, 131S	3	9H, 41T, 44RKE
5	A*0101	A*0201	B*0702	B*4403	Cw*0501	Cw*0702	3	44RTE, 76ERI, 113HN	3	9H, 70AKA, 82LLR	2	9H, 113HN
6	A*0101	A*0201	B*4501	B*3901	Cw*0501	Cw*1701	3	44RTE, 76ERI, 82ALR	4	65QIA, 70AKA, 76ERT, 82LLR	0	none
7	A*0101	A*2501	B*5501	B*3701	Cw*0602	Cw*0702	2	116Y, 163L	3	70AKA, 113YH, 163E	4	41T, 44RKE, 116Y, 163E
8	A*0101	A*2501	B*3501	B*4101	Cw*0602	Cw*0401	0	None	8	44REE, 65QIA, 70AKA, 73TD, 76ERT, 82LLR, 113YH, 16	1	163E

Tableau 5 : Différence entre donneur/receveur et charge épitopique

D'après Duquesnoy RJ ref [80]

Nous devons cependant faire la distinction entre charge épitopique, reliée à la capacité des antigènes HLA à être reconnus par des anticorps anti-HLA, et immunogénicité, c'est-à-

dire leur capacité à induire la synthèse d'anticorps anti-HLA. Il est fort probable que les eplets et les épitopes qui les contiennent ne possèdent pas tous la même immunogénicité intrinsèque, et qu'en fonction des différences avec son donneur un receveur ne soit pas capable de produire des anticorps anti-HLA contre tous les eplets du non-soi, ou bien uniquement des anticorps de faible affinité ou peu pathogènes. En parallèle, il a été montré que les différences en termes d'hydrophobicité et de charge électrostatique entre les épitopes différenciant le donneur et le receveur pouvaient aussi influencer la production d'anticorps anti-HLA de classe I (81).

Néanmoins, il apparaît que les greffes incompatibles en termes d'antigène A et B, c'est-à-dire sans anticorps anti-HLA préformés mais avec des antigènes HLA différents entre donneur et receveur, mais compatibles en termes de triplets/eplets ont la même survie que les greffes sans incompatibilité antigénique HLA (82). Le nombre d'incompatibilités de triplets offrirait également une valeur prédictive du développement d'anticorps après une grossesse ou une transplantation (83, 84). Dans sa dernière version, HLAMatchmaker permet une analyse des eplets reconnus par les anticorps anti-HLA d'un receveur et ainsi de déterminer quels sont les eplets autorisés et interdits. Utilisé par le réseau Eurotransplant pour l'attribution des greffons aux patients hyperimmunisés, il a permis une réduction du délai d'attente avec de bons résultats en termes de survie du greffon (85).

En parallèle, l'équipe de Terasaki a utilisé une autre approche, complémentaire, ne reposant pas uniquement sur une théorie structurale mais également sur une réelle immunogénicité. Elle repose sur l'étude de la réactivité d'anticorps anti-HLA monoclonaux de souris et d'allosérums de sujets immunisés, adsorbés sur des lignées cellulaires exprimant un antigène HLA donné unique, élués puis testés avec la technique Single Antigen en format Luminex[®] (SAG) (86). Pour chaque groupe d'antigènes réactifs avec un anticorps monoclonal ou un allosérum donné, une analyse comparative de la séquence en acides aminés permettait par déduction d'identifier les motifs communs exposés à la surface de la molécule et situés à des distances compatibles avec la taille d'un site de reconnaissance par un anticorps. Avec cette approche, 103 épitopes de classe I et 83 épitopes de classe II ont été définis (87).

De manière intéressante, une étude comparative a montré que 81 des 103 épitopes de Terasaki correspondaient à des eplets ou des paires d'eplets, 12 épitopes à des eplets avec des combinaisons de résidus qui n'affectent pas la spécificité de l'épitope, et 10 épitopes ne correspondaient à aucun eplet (88). A noter qu'HLAMatchmaker identifiait 38 eplets dans des positions bien exposées qui ne correspondaient à aucun équivalent épitopique déterminé par l'équipe de Terasaki. Ceci pouvait être dû à la non-exhaustivité du panel d'anticorps utilisé et également au fait qu'une partie des anticorps utilisés était d'origine xénogénique et donc pas forcément comparable aux anticorps rencontrés au cours d'une réponse allogénique chez l'homme. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'immunogénicité théorique des eplets et immunogénicité réelle ne sont pas systématiquement associées.

3.2 Anticorps anti-HLA : origine

3.2.1 Génération des cellules productrices d'anticorps anti-HLA

Les trois principales sources d'allo-immunisation vis-à-vis des antigènes HLA sont la grossesse, la transfusion sanguine (hématies et plaquettes) et la transplantation d'organe (89). Lors d'une première exposition d'un individu à des cellules étrangères portant des molécules HLA différentes des siennes, les lymphocytes B naïfs capables de reconnaître un des épitopes étrangers pourront s'activer en se liant à ces molécules via leur BCR, au sein des organes lymphoïdes secondaires, plus particulièrement au niveau des sinus sub-capsulaires et du paracortex. Les molécules HLA parviennent à cet endroit via les vaisseaux lymphatiques, sous forme libre ou transportées par les cellules dendritiques ou les macrophages (90-95). Ces lymphocytes B activés doivent alors migrer à l'interface de la zone folliculaire B et de la zone T afin de recevoir l'aide des lymphocytes T alloréactifs indirects.

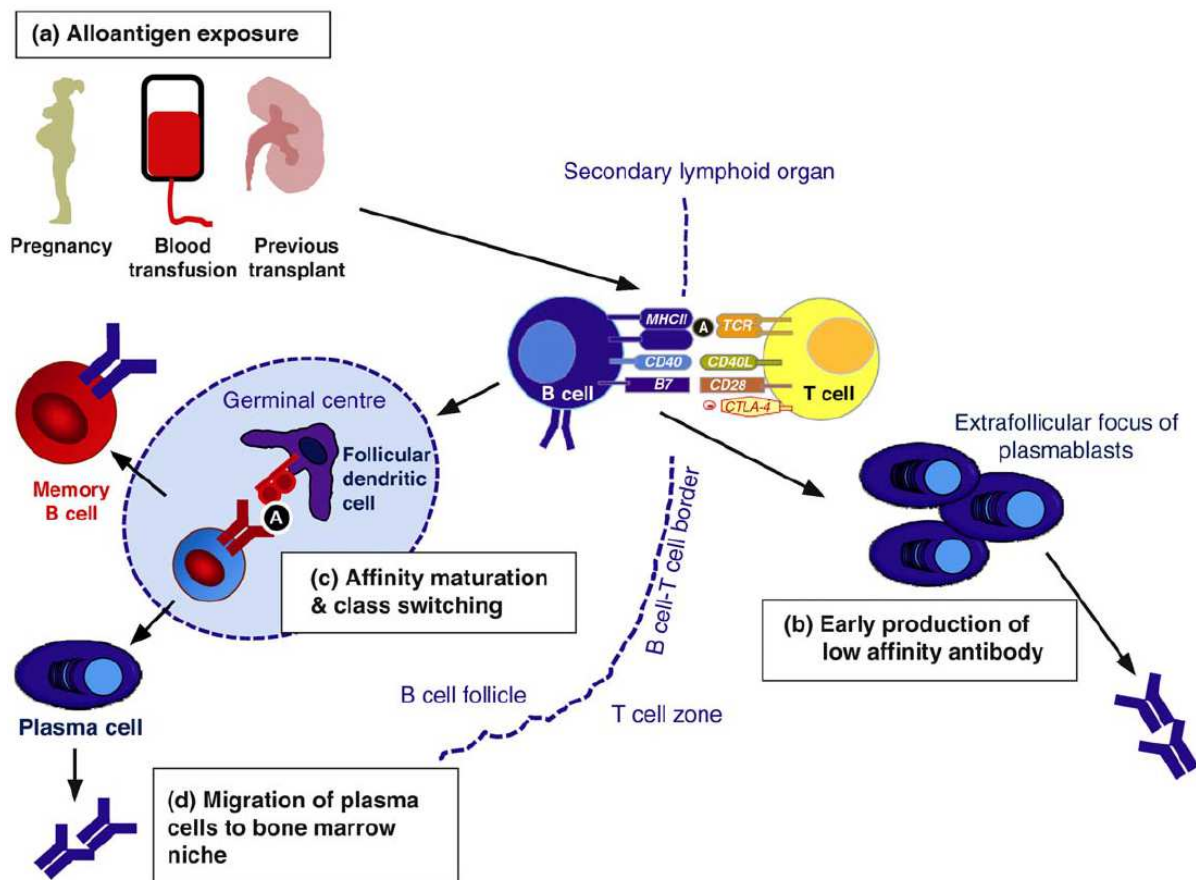


Figure 21 : Production des anticorps anti-HLA

D'après Clatworthy *et al.* ref [89]

Il est important de noter que la production d'anticorps anti-HLA lors d'une première exposition à ces alloantigènes dépendra fortement du contexte dans lequel l'exposition a lieu. En effet, la coopération T/B ne sera possible qu'avec des lymphocytes T naïfs qui auront rencontré une cellule dendritique activée par des signaux de « danger », typiquement induits lors d'une infection ou de la phase d'ischémie/reperfusion d'un organe transplanté. La présentation par les lymphocytes B, via les molécules HLA de classe II, de peptides étrangers

en provenance des molécules HLA elles-mêmes ou bien d'autres protéines présentant des polymorphismes uniques à la source de l'immunisation, active à son tour les lymphocytes T. Ceux-ci expriment alors des molécules de co-stimulation, telles que le CD40L, et sécrètent des cytokines qui vont induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Des études récentes ont essayé de mettre en relation le nombre de peptides présentables par les molécules HLA-DR des lymphocytes B en provenance de molécules HLA étrangères et la survenue d'une immunisation anti-HLA. Il semble qu'un plus grand nombre de peptides présentables soit lié à un plus fort risque d'immunisation (96).

Une première partie des lymphocytes B se différenciera directement en plasmocytes à courte durée de vie qui sécréteront des anticorps anti-HLA de classe IgM de faible affinité. Une deuxième partie de ces lymphocytes B passera par le centre germinatif où la coopération avec les lymphocytes Tfh permettra la mise en jeu de la commutation isotypique et des hypermutations somatiques qui aboutiront à la génération de clones lymphocytaires B produisant principalement des anticorps anti-HLA de classe IgG et de meilleure affinité que les IgM initialement exprimées. Ceux-ci deviendront des plasmocytes à longue durée de vie, responsables du maintien des IgG anti-HLA dans le sérum (97) ou bien des lymphocytes B mémoires.

Les plasmocytes à longue durée de vie sont situés au sein de la moelle osseuse où ils trouvent toutes les cytokines et les interactions cellulaires dont ils ont besoin pour survivre (97-99). De manière intéressante, plusieurs équipes ont décrit la présence de plasmocytes au sein d'organes transplantés en rejet humoral, associée à un mauvais pronostic (100-102). Ceci pourrait être rendu possible via la formation d'organes lymphoïdes tertiaires au sein de l'organe transplanté (103).

Les lymphocytes B mémoires constituent 40 à 50% des lymphocytes B circulants. Plusieurs équipes ont montré la possibilité de détecter des lymphocytes B alloréactifs après stimulation polyclonale chez les patients hyperimmunisés en attente de transplantation rénale (104) ou chez des patients transplantés à l'aide de tétramères HLA (105, 106). Une étude récente utilisant la technique ELISPOT a décrit la possibilité de détecter, avant la transplantation, une réponse mémoire B dirigée contre le donneur sans détection d'anticorps dirigés contre le donneur (DSA pour *donor-specific antibodies*) circulants, et pouvant conduire à une production rapide de DSA puis à un rejet humoral (107). Une autre équipe a mis en évidence le développement de lymphocytes B alloréactifs dans la période précoce après transplantation, malgré l'immunosuppression et l'absence de détection de DSA circulants (108). Ces cellules pourraient alors être impliquées dans la génération rapide d'anticorps anti-HLA non détectables dans le sérum mais pouvant être à l'origine d'un certain nombre de rejets inexpliqués.

3.2.2 La grossesse

La grossesse est une cause majeure d'immunisation contre les antigènes HLA paternels, en raison de l'existence d'un trafic cellulaire bidirectionnel entre les circulations sanguines maternelles et fœtales, augmentant au cours de la grossesse (109). De plus, un certain nombre de cellules fœtales passe dans la circulation sanguine de la mère au moment de la délivrance, ce qui explique que les anticorps puissent apparaître plus souvent au cours du troisième trimestre ou après l'accouchement (110). Une étude s'intéressant à 5834 femmes donneuses de sang a montré une incidence globale des anticorps anti-HLA, détectés en dépistage Luminex[®], de 24,4% chez celles ayant eu au moins une grossesse contre 1,7% chez

celles n'en ayant pas eu (111). L'incidence des alloanticorps augmente avec le nombre de grossesses : 11,2% pour une, 22,5% pour deux, 27,5% pour trois et 32,2% pour quatre ou plus. Elle est également plus importante dans le cas d'une grossesse menée à terme (32%) qu'après un avortement spontané (10%). Le plus souvent, ces anticorps diminuent rapidement et disparaissent à distance de l'accouchement, mais ils peuvent persister pendant plusieurs années (112). La persistance des anticorps pourrait être liée à la présence permanente d'antigènes paternels chez la mère par la persistance de cellules fœtales (113). Un tel microchimérisme a été décrit chez 66% des patientes immunisées versus 25% des patientes non immunisées (114). Les antigènes fœtaux pourraient également être conservés par les cellules folliculaires dendritiques et présentés en permanence aux lymphocytes B mémoire spécifiques, ce qui favoriserait leur survie (115).

3.2.3 Les transfusions

Les transfusions d'éléments figurés du sang que sont les hématies et les plaquettes peuvent également conduire à la production d'anticorps anti-HLA, qu'ils soient déleucocytés ou non déleucocytés. En effet, les plaquettes expriment les molécules HLA de classe I en grande quantité et les hématies en expriment également, mais de manière moindre (116). La fréquence de l'immunisation par anticorps anti-HLA chez les individus transfusés de culots globulaires était de 10 à 12% dans d'anciennes études utilisant la LCT ou l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pour leur détection (117-119). Dans une étude plus récente portant sur 7920 donneurs de sang (2086 hommes et 5834 femmes), la prévalence des anticorps anti-HLA en dépistage Luminex[®] ne différait pas entre les hommes transfusés ou non (1,7% vs 1,0%), ni chez les femmes nullipares transfusées ou non (4,4% vs 1,6%) (120). Le rôle des transfusions de culots globulaires dans l'allo-immunisation anti-HLA semble donc minime chez l'adulte. En revanche, le risque d'alloimmunisation après transfusion est plus important chez les enfants : 35% avant 20 ans versus 7,5% après 20 ans (118). Un autre facteur de risque est le recours à des transfusions massives : il existe alors une relation nette entre le nombre de transfusions réalisées et l'incidence de l'allo-immunisation qui peut être de plus de 50% chez les drépanocytaires (121). Enfin, concernant l'effet de la déleucocytation des concentrés érythrocytaires, une étude prospective randomisée portant sur 107 patients n'a pas montré de différence en termes de fréquence d'alloimmunisation (122), ce qui a été confirmé dans d'autres études (119, 123).

3.2.4 La transplantation d'organes

La transplantation d'un organe solide est une cause majeure de développement d'anticorps anti-HLA. L'apparition des techniques de détection sensibles et résolutes telles que le SAG a permis de mieux apprécier l'incidence de la production des anticorps anti-HLA *de novo* chez les patients transplantés, notamment ceux dirigés contre le donneur (DSA pour *donor specific antibodies*). Cette incidence est estimée entre 8 et 25 % et augmente avec le temps écoulé depuis la transplantation (124-127). La perte du greffon puis la remise en dialyse et la diminution de l'immunosuppression, parfois due à un défaut d'observance du patient, sont les facteurs les plus à risque de développer des anticorps anti-HLA (128). De même, une perte du greffon rénal dans les premiers jours après la transplantation et nécessitant une transplantectomie est généralement suivi par une production d'anticorps anti-HLA, même si le temps de contact avec le greffon est très court (128-130).

3.2.5 Anticorps anti-HLA « naturels »

Dans les années 1970, certains auteurs ont décrit l'existence d'anticorps anti-HLA « naturels » de type IgM détectés en LCT, c'est-à-dire détectés chez des donneurs de sang n'ayant jamais connu d'évènement allo-immunisant (131, 132). L'émergence des techniques ultra-sensibles utilisant la technologie Luminex[®] a ensuite permis la mise en évidence de l'existence d'anticorps anti-HLA d'isotype IgG chez ce même type de sujets (133).

La première hypothèse qui a été avancée pour expliquer la présence de tels anticorps est l'existence d'une réactivité croisée entre des épitopes HLA et ceux de certains micro-organismes, de protéines alimentaires ou d'allergènes. En effet, certains auteurs ont montré une analogie entre certains composants bactériens et certaines molécules HLA, expliquant pourquoi ceux-ci pouvaient inhiber des réactions de LCT. C'est le cas de la protéine M1 du streptocoque (134), de certains lipopolysaccharides de *E. coli* et de *Salmonella sp.* (135), des antigènes de *Klebsiella pneumoniae* (136), *Shigella sp.* (137) et *Yersinia sp.* (138).

Par ailleurs, d'autres travaux ont rapporté l'hypothèse que certains de ces anticorps pouvaient correspondre à des auto-anticorps anti-HLA-E. En effet, les molécules HLA-A, -B et -C, dites « classiques » ou Ia partagent un certain nombre de séquences peptidiques avec HLA-E, qui est une molécule communément exprimée, peu polymorphe et classifiée comme une molécule HLA « non classique » ou Ib (139). Ainsi, 66% des sérums issus de sujets de sexe masculin « sains » ayant des anticorps anti-HLA-E en technique Luminex[®] montraient un niveau élevé d'IgG anti-HLA de classe Ia. A l'opposé, 70% des sujets qui n'avaient pas d'anticorps anti-HLA-E dans leur sérum n'avaient pas non plus d'anticorps anti-HLA-Ia. Ces réactivités étaient de plus inhibées par des peptides AYDGKDY et DTAAQIS dont les séquences sont communes à la chaîne lourde de la molécule HLA-E et à celle de certaines molécules HLA de classe Ia.

Enfin, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire entre protéines animales alimentaires et molécules HLA pour expliquer la présence d'anticorps anti-HLA naturels (140). Cependant, dans l'étude précédemment citée de Ravindranath et coll. (139), l'absence d'anticorps anti-HLA-Ia chez 112 donneurs de sang consommateurs de viande et la présence d'anticorps chez des sujets végétaliens suggéraient une absence d'implication des protéines animales alimentaires concernant la production des anticorps anti-HLA-Ia naturels.

3.3 Anticorps anti-HLA : pathogénicité

En transplantation d'organe, la cible la plus immédiate des anticorps anti-HLA plasmatiques est l'endothélium vasculaire qui est situé à l'interface entre le greffon et la circulation sanguine du receveur (141, 142). En effet, un certain nombre d'études récentes étudiant le transcriptome cellulaire révèlent une implication majeure de l'endothélium lors des rejets humoraux (143-145).

Historiquement, la pathogénicité des anticorps anti-HLA était entièrement attribuée à leur capacité d'activer la voie classique du complément. En effet, c'est ce mécanisme qui était en cause dans les rejets hyper aigus observés avant que le crossmatch (XM) LCT ne soit utilisé, l'activation massive du complément par les anticorps anti-HLA entraînant une thrombose immédiate et un infarctus du greffon (146). Le XM représente le test ultime de compatibilité donneur/receveur avant transplantation et sera détaillé plus tard. Cependant,

l'activation du complément peut également entraîner des lésions plus indolentes, entraînant un déclin lent et progressif de la fonction du greffon associé à des dépôts de complément au niveau de la paroi vasculaire. Ainsi, la détection du produit de dégradation du facteur C4, c'est-à-dire le C4d, dans les biopsies du greffon, a longtemps constitué un critère diagnostique majeur, sinon indispensable, du rejet humoral (147). Cependant, l'existence de rejets humoraux négatifs pour le marquage C4d a été progressivement reconnue et inclus dans les schémas diagnostiques des transplantations rénales et cardiaques (148).

Les modèles expérimentaux murins suggèrent une implication indispensable de l'activation du complément dans le phénomène de rejet aigu humoral (149), mais l'épaississement de l'intima observé dans des modèles de rejet humoral chez des souris déficientes en complément suggère que l'activation du complément n'est pas nécessaire au processus du rejet chronique (150). Ainsi, d'autres mécanismes impliquant les récepteurs aux Fc et l'activation de la cellule endothéliale ont été montrés comme impliqués dans les phénomènes de rejet humoral.

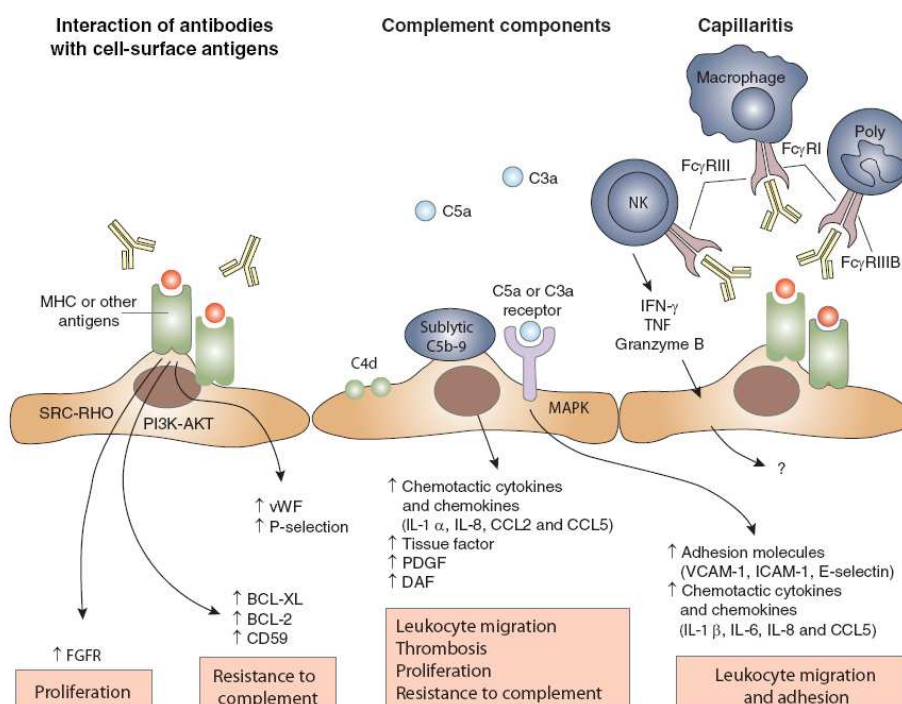


Figure 22 : Mécanismes d'agression du greffon par les anticorps anti-HLA

D'après Djamali *et al.* Am J Transplant 2014

3.3.1 Activation du complément

Les mécanismes d'activation de la voie classique du complément par les anticorps, et ses conséquences générales, ont été décrits plus tôt dans ce mémoire. En transplantation d'organe, l'activation du complément au contact de l'endothélium du greffon entraîne un recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives, notamment via les anaphylatoxines C3a et C5a. La molécule C3a possède également un effet vaso-actif en induisant la libération de prostaglandine E2 par les macrophages, et C5a induit un œdème en provoquant la libération d'histamine par les mastocytes, avec pour conséquence une augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, C3a et C5a induisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, comme la E-selectine, VCAM1 (vascular

cell-adhesion molecule 1) et ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), ainsi que la synthèse de cytokines et de chimiokines, comme l'interleukine-1 α (IL-1 α), IL-6, CCL5 (ou RANTES) et CXCL8 (ou IL-8) et favorisent également la signalisation intracellulaire par la voie des MAPkinases (151). La voie terminale commune, entraînant la formation du CAM puis une lyse osmotique des cellules ciblées, ne serait en revanche que peu impliquée dans les mécanismes de rejet humoral (147).

De plus, le C3d, produit de dégradation du C3b lié de manière covalente au greffon, est reconnu par le CR2 exprimé par les lymphocytes B, ce qui abaisse leur seuil d'activation en présence de l'antigène. Les produits de dégradation du complément sont également reconnus par les CR1, CR2 et CR3, exprimés par les cellules dendritiques folliculaires et leur permettant de capter l'antigène, de le retenir plus longtemps à leur surface afin de jouer leur rôle dans les processus de l'augmentation de l'affinité des lymphocytes B au sein du centre germinatif.

L'activation du complément a également un rôle pro-coagulant, les cascades du complément et de la coagulation comprenant toutes deux des protéases à sérine et pouvant donc s'interconnecter (152), avec pour conséquence la survenue d'évènements thrombotiques péjoratifs. De manière intéressante, l'activation du complément peut ne pas conduire à la génération de lésions de la cellule endothéliale, notamment dans le cadre des transplantations incompatibles en ABO (153-155). Ce phénomène, appelé l'accommodation, n'a jamais vraiment été décrit dans les rejets induits par les anticorps anti-HLA (156, 157) et est donc toujours matière à discussion.

La capacité des anticorps anti-HLA à activer le complément à la surface du greffon dépendrait d'un certain nombre de facteurs. Certains sont liés à l'anticorps lui-même : isotype (classe et sous-classe), glycosylation, concentration et affinité. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux IgG anti-HLA, les études sur les sous-classes IgG montrent que les IgG1 sont présentes chez la quasi-totalité des patients, alors que les IgG2, 3 et 4 sont détectées dans moins de 40% des cas (158-165). Par exemple, il a été récemment décrit, dans une cohorte de 51 patients présentant 138 anticorps anti-HLA de classe I et II, que seulement 12 (9%) de ces anticorps n'avaient pas de composante IgG1, dont 11 d'entre eux avaient une composante IgG3 (165). Lefaucheur et coll. ont retrouvé les mêmes tendances dans une cohorte de 104 transplantés rénaux présentant des DSA dans la première année post-transplantation : seulement 10 (8%) ne présentaient pas d'IgG1 et 5 (4%) ni IgG1/3 (166). Ces résultats indiquent que la plupart des patients possèdent des IgG anti-HLA capables, en théorie, d'activer le complément, car possèdent un Fc capable de lier le C1q. Néanmoins, les techniques permettant de détecter la fixation (C1q) ou l'activation (C3d) du complément par les anticorps anti-HLA *in vitro* donnent des résultats contradictoires en termes de lien avec la survie du greffon (159, 163, 167-175). Ceci implique que d'autres paramètres intrinsèques beaucoup moins explorés que l'isotype de l'anticorps, tels que sa glycosylation (176-178), sa concentration ou son affinité, pourraient jouer un rôle crucial dans sa capacité à activer le complément *in vivo* et sa pathogénicité.

Par ailleurs, des facteurs extrinsèques à l'anticorps anti-HLA, impliquant l'antigène lui-même à la surface de la cellule, tels que la densité antigénique ou encore la disposition/orientation des épitopes, pourraient jouer un rôle dans leur capacité à activer le complément. Les cellules endothéliales expriment de manière constitutive les molécules HLA de classe I, et en fonction de leur origine et des conditions de culture celles de classe II (61), ce de manière plus importante en conditions inflammatoires (179). Plusieurs études *in vitro* ont montré une augmentation de l'activation du complément par les anticorps anti-HLA si

ceux-ci sont en plus grande quantité à la surface cellulaire (180, 181). De plus, la fixation de plusieurs anticorps anti-HLA reconnaissant des épitopes différents a été montrée comme pouvant entraîner un phénomène synergique pour l'activation du complément, en fonction de l'orientation de ceux-ci (160). Enfin, la variation des concentrations des protéines du complément, en fonction des polymorphismes présents chez les patients, et de la situation clinique (hyperconsommation, baisse de production, augmentation des pertes) pourrait également moduler la capacité des DSA à activer le complément à la surface du greffon. Ceci a notamment été démontré pour le facteur C4 (182).

3.3.2 Interaction avec les récepteurs des fragments Fc

Les biopsies en provenance de greffon rénaux et cardiaques en cours de rejet humoral montrent fréquemment une infiltration de macrophages CD68+ dans les espaces microvasculaires et périvasculaires (183-186), et de neutrophiles en transplantation pulmonaire (187). Les études de transcriptome réalisées à partir de biopsies révèlent également une implication des cellules NK (natural killer) dans ces rejets (143, 188-190). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les modèles animaux impliquant les cellules NK dans les rejets chroniques humoraux (191).

De manière intéressante, tous ces types cellulaires expriment des récepteurs pour le fragment Fc des Ig (192), notamment ceux pour les IgG. Les FcγR sont nécessaires à l'ADCC induite par les monocytes, macrophages et cellules NK (193). Un modèle murin a été utilisé afin de montrer que l'activité phagocytaire liée aux macrophages augmentait lors d'un rejet de greffe rénale (194), sachant que les FcγR sont connus pour jouer ce rôle chez les macrophages et les neutrophiles. Enfin, les FcγR augmentent le recrutement des monocytes au niveau d'un endothélium activé par des anticorps anti-HLA (195, 196).

L'existence de variants alléliques des FcγR pourrait moduler la capacité des DSA à recruter ces cellules immunitaires et à activer l'ADCC (196), de même que le type de glycosylations de ces derniers, les anticorps non galactosylés ayant été montrés comme plus inflammatoires que ceux étant galactosylés ou sialylés (43, 178).

3.3.3 Activation des cellules endothéliales

Il est communément admis que les cellules endothéliales ne jouent pas uniquement le rôle de cible dans les processus de rejet humoraux, mais ont également un rôle actif dans la régulation positive ou négative de la réaction immunitaire (197).

Les premiers travaux en transplantation montraient que la liaison des anticorps anti-HLA de classe I à la surface de cellules endothéliales et musculaires lisses en culture entraîne le déclenchement d'une signalisation intracellulaire via les intermédiaires *focal adhesion kinase* (FAK), Akt, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), S6 kinase (S6K), S6 ribosomal protein (S6RP) et *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2), avec pour conséquence une réorganisation du cytosquelette, une prolifération, une migration et une augmentation de la survie cellulaire (198-203). La prolifération des cellules endothéliales correspond à la vasculopathie du greffon (VT pour *transplant vasculopathy*) observée dans les rejets chroniques humoraux. La VT est une maladie vaso-occlusive progressive dont la présentation histologique correspond à une prolifération et une hyperplasie des cellules endothéliales et des

cellules musculaires lisses vasculaires, induisant une ischémie du greffon puis une dégradation progressive de sa fonction.

Les anticorps anti-HLA de classe I sont également capables de stimuler la production de P-sélectine et ainsi l'adhésion de monocytes et neutrophiles à l'endothélium (204, 205), l'exocytose de facteur Willebrand permettant la capture, l'activation et l'agrégation des plaquettes (206), et enfin la production de cytokines et chimiokines (181, 203).

Les anticorps anti-HLA de classe II stimulent également la prolifération cellulaire en activant la voie S6K/S6RP (207) et en augmentant la phosphorylation des tyrosines puis l'activation de la voie NFκB (208). Ils induisent également la production de chimiokines CCL2 et CXCL1 par des cellules endothéliales murines (209).

Ces données *in vitro* ont été confirmées par un certain nombre d'études récentes utilisant l'analyse transcriptomique et révélant une activation des cellules endothéliales lors des rejets humoraux (143-145).

Il est important de noter que la capacité des anticorps anti-HLA à activer les cellules endothéliales dépend de leur bivalence, et donc de leur capacité d'agrégation (ou « *cross-linking* ») des molécules HLA à la surface cellulaire, étant donné qu'un fragment F(ab')₂, et non un Fab, possède la même activité qu'une IgG entière, et donc que cette activité ne semble pas dépendre de la sous-classe, des FcγR ou encore de l'activation du complément. Encore une fois, la densité antigénique/épitopique, l'orientation des épitopes, la concentration et l'affinité des anticorps anti-HLA pourraient moduler ces mécanismes d'action.

3.4 Anticorps anti-HLA en transplantation d'organe

Durant les trois premières décennies de la transplantation d'organe, les efforts ont convergé vers la mise au point de traitements immunosuppresseurs actifs sur les lymphocytes T, le principal succès étant les inhibiteurs de la calcineurine qui ont permis de réduire l'incidence des rejets aigus cellulaires et une augmentation de la survie à court terme des organes transplantés. Néanmoins, la survie des greffons à long terme n'a été que modestement améliorée.

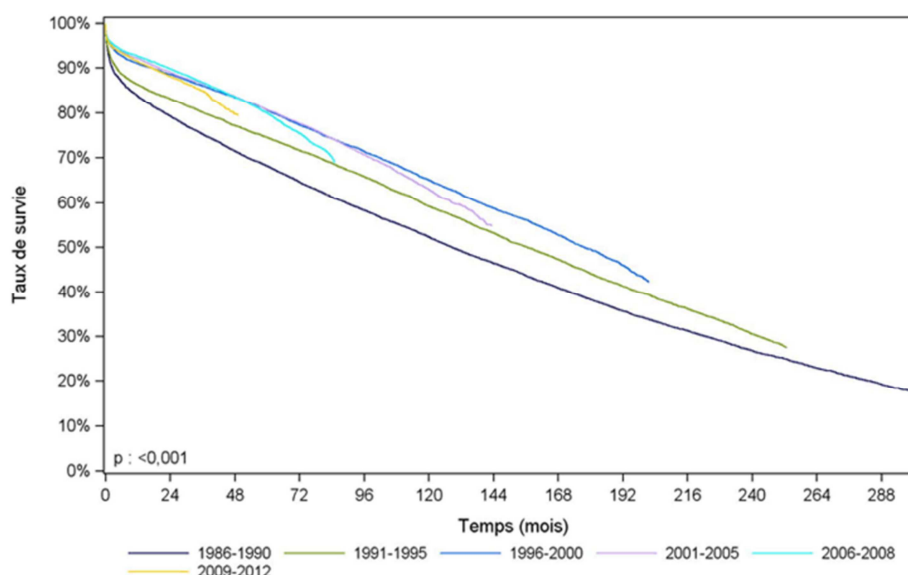


Figure 23 : Survie du greffon rénal selon la période de greffe

Tiré du rapport Annuel de l'Agence de la Biomédecine 2013

L'évolution des techniques permettant de détecter les anticorps anti-HLA a éclairé notre vision de ces pertes de greffon tardives qui semblent en majorité dues à la réponse allo-immune humorale. En effet, quel que soit l'organe, la présence de DSA entraîne un cortège de lésions inflammatoires aiguës et/ou chroniques altérant la fonction et la survie du greffon à plus ou moins long terme. Les premiers travaux s'intéressaient plus particulièrement aux DSA anti-HLA-A, -B et -DR, mais les publications les plus récentes indiquent que les anti-HLA-Cw, -DR51, -DR52, -DR53, -DQ (chaîne alpha et beta) et -DP (chaîne alpha et beta) doivent également être pris en compte (210-215).

3.4.1 Les DSA préformés

Historiquement, la présence de DSA préformés était associée à la survenue de rejets humoraux hyperaigus en transplantation rénale (146) mais également thoracique (216, 217). La mise en place des techniques de XM LCT a permis de réduire voire faire disparaître ces rejets.

En transplantation rénale, il est connu depuis longtemps que les transplantations réalisées avec un XM LCT positif aboutissent à une survie du greffon limitée (146). Plusieurs travaux ont montré que les patients ayant un XM par cytométrie en flux (CMF) positif avaient également une survie du greffon diminuée (218). Dans une étude récente portant sur 400

patients transplantés rénaux, Lefaucheur et coll. ont montré que la survie des greffons à 8 ans était significativement inférieure en présence de DSA (60,8%) comparée à celle des patients non immunisés (83,6%) et des patients porteurs d'anticorps anti-HLA non dirigés contre le greffon (92,5%) (219). De plus, la présence de DSA, même en l'absence d'un épisode de rejet aigu humoral, était associée à une diminution de la survie du greffon (à 8 ans 69,5% versus 84,4% en l'absence de DSA). Une méta-analyse incluant sept études de cohortes rétrospectives totalisant plus de 1100 patients a de plus montré que la présence de DSA isolés (c'est-à-dire avec un XM CMF négatif) doublait le risque de rejet humoral et augmentait le risque de perte du greffon (220). Ces trois travaux sélectionnés ont été confirmés par de nombreuses autres études (221-223).

En transplantation cardiaque et pulmonaire, les données de la littérature sont moins abondantes et sont apparues plus tardivement qu'en transplantation rénale. Néanmoins, il a clairement été démontré que la présence de DSA préformés est associée à la survenue d'épisodes de rejet humoral aigu ou à la mise en place d'un rejet chronique, et d'une moins bonne survie du greffon (216, 224-231).

En transplantation hépatique, les données de la littérature sont plus discordantes que pour les autres organes. Le foie serait plus résistant aux rejets hyperaigus et aigus liés aux DSA préformés (232-234) mais l'altération du greffon serait tout de même possible (235-241). Ceci serait d'autant plus vrai dans le cadre du don vivant pour lesquels sont utilisés des « splits » de foie, qui sont de plus petite taille et pourraient être moins résistants à l'agression liée aux DSA préformés (242, 243). Enfin, la MFI des DSA pourrait avoir une importance dans la survenue d'un rejet chronique après transplantation hépatique (244).

La mise en évidence de l'effet néfaste des DSA préformés et l'apparition des techniques sensibles ont engendré la naissance d'une approche permettant d'éviter les transplantations rénales à risque de rejet humoral : c'est le XM virtuel (245-248). Le but du XM virtuel est d'anticiper le résultat du XM réel sur la base des spécificités présentes dans le sérum du patient et de récuser d'emblée les donneurs contre lesquelles elles sont dirigées. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, cela augmente l'accès à la greffe des patients les plus immunisés par une meilleure régulation du flux des greffons vers les patients pour lesquels le XM sera négatif (249). Cette approche est également extrêmement utile en transplantation thoracique pour prédire le risque immunologique en raison du fait que la durée d'ischémie tolérable ne permet souvent pas de réaliser le XM réel avant que la transplantation n'ait lieu.

3.4.2 Les DSA *de novo*

Les DSA *de novo* peuvent survenir à n'importe quel moment après la transplantation et leur incidence augmente avec le délai post-transplantation (250). Ils témoigneraient d'une immunosuppression insuffisante, soit parce que le patient nécessite intrinsèquement un traitement plus lourd que le traitement « standard » pour contrôler son immunité humorale, soit parce que l'immunosuppression a été diminuée en raison de complications infectieuses, tumorales ou d'une mauvaise observance thérapeutique.

En transplantation rénale, l'incidence des DSA *de novo* est de 15 à 30% à 10 ans. La valeur pronostique péjorative de ces anticorps a bien été mise en évidence (124, 125, 127, 251-254). Notamment, une étude de Wiebe et coll. a montré pour les patients porteurs de DSA *de novo* une survie à 10 ans très inférieure à celle des patients n'en ayant pas (59%

versus 96%) (127). Par ailleurs, il semblerait que les DSA *de novo* aient une valeur pronostique plus péjorative que les DSA préformés (252).

En transplantation cardiaque, le développement de DSA *de novo* est associé à la survenue de rejet (169, 255-258). Par exemple, dans l'étude de Zhang et coll. s'intéressant à 168 transplantés cardiaques, les DSA *de novo* étaient détectés chez 22/37 (60%) patients ayant un diagnostic de rejet humoral [selon les critères de l'époque (259)], contre seulement 6/131 (4,6%) des patients sans rejet (258). Les DSA *de novo* sont également associés au développement d'une vasculopathie d'allogreffe (CAV pour *cardiac allograft vasculopathy*), correspondant au rejet chronique du greffon (260, 261).

En transplantation pulmonaire, les DSA *de novo* ont été incriminés dans le développement du syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS pour *bronchiolitis obliterans syndrome*) et une diminution de la survie du greffon (262-267). De manière intéressante, une étude a montré que la clairance des DSA *de novo* par un traitement associant les IgIV et/ou le rituximab pouvait conduire à une augmentation de la survie sans développement de BOS, suggérant le lien direct entre DSA et rejet chronique du greffon pulmonaire (268).

Les données sur les DSA *de novo* en transplantation hépatique sont limitées, mais une étude récente a montré une incidence de DSA *de novo* à hauteur de 8% à 1 an et une association de ceux-ci à une survie du greffon inférieure (126).

3.4.3 Caractéristiques du rejet humoral

Hormis les rejets humoraux hyperaigus liés aux DSA préformés de forte intensité et ayant quasiment disparu grâce à la mise en place des techniques de XM (146, 216, 217), l'agression humorale des greffons peut s'opérer selon trois modes pouvant découler les uns des autres : le rejet humoral infraclinique, le rejet aigu humoral et le rejet chronique humoral. En effet, le rejet humoral doit être considéré comme un continuum, une maladie progressive et chronique liée à la présence des DSA, et non un épisode sporadique émaillant l'évolution d'une transplantation (269).

Les plus grandes avancées ont eu lieu en transplantation rénale grâce à l'apparition des techniques en phase solide pour la détection des DSA, mises en parallèle avec les observations histologiques de lésions aiguës spécifiques des rejets aigus humoraux, associant insuffisance rénale aiguë et présence de DSA circulants. Ces signes histologiques sont regroupés dans la classification de Banff, régulièrement remise à jour lors de conférences de consensus et décrivant également les lésions chroniques (270). Le rejet humoral aigu ou actif du greffon rénal associe le plus souvent des signes histologiques d'inflammation des micro-vaisseaux (glomérulite et capillarite péri-tubulaire) ou des artères. Les épisodes de rejets aigus humoraux peuvent survenir précocement chez des sujets préalablement immunisés et porteurs de DSA préformés, mais également de façon retardée suite à la synthèse de DSA *de novo*. A noter que le marquage C4d, critère diagnostique majeur dans les premières classifications, n'est plus indispensable en raison de ses faibles sensibilité et spécificité.

En transplantation cardiaque, un rejet humoral aigu sera suspecté en cas d'une altération de la fonction cardiaque et sera diagnostiqué à l'aide de la biopsie endomyocardique sur laquelle on recherchera l'accumulation de macrophages CD68+ et un gonflement des cellules endothéliales. Les formes les plus sévères pourront associer, parmi d'autres, des

signes d'hémorragie, un œdème interstitiel, une nécrose myocytaire et un infiltrat inflammatoire plus varié et diffus (183).

En transplantation pulmonaire, le diagnostic nécessite le recours à une approche pluridisciplinaire, prenant en compte la présence d'une dysfonction clinique du greffon (évaluation spirométrique et radiographique), de DSA circulants, et de lésions anatomopathologiques. Il existe de nombreux patterns histologiques attribués au rejet humoral mais aucun d'eux n'est spécifique. Ceux-ci incluent une infiltration à polynucléaires neutrophiles, différenciée sous les termes de « capillarite à neutrophiles » et de « margination de neutrophiles », des lésions de dommage alvéolaire diffus, mais aussi le rejet aigu cellulaire de haut grade, la bronchiolite lymphocytaire de haut grade, l'artérite et la bronchiolite oblitérante (183, 187, 271, 272).

En transplantation hépatique, la considération croissante de l'existence de rejets à médiation humorale a conduit à la définition de signes histologiques diagnostiques : les signes positifs sont une éosinophilie et une hypertrophie des cellules endothéliales au niveau de la veine porte, et une éosinophilie au sein des veinules centrales, et les signes négatifs le même type d'infiltration mais de type lymphocytaire (273). Ces signes seraient plus facilement retrouvés dans le cadre des rejets sévères et un diagnostic définitif nécessiterait une confirmation par la présence de DSA circulants, d'un marquage C4d diffus et de l'exclusion d'autres causes de rejets.

Le rejet humoral infraclinique correspond à la présence de DSA associée à des lésions histologiques sans retentissement sur la fonction du greffon. Celui-ci a notamment été mis en évidence en transplantation rénale par la surveillance systématique des biopsies de patients transplantés avec des DSA préformés, montrant des lésions histologiques typiques de rejet aigu humoral (capillarite glomérulaire et péri tubulaire +/- marquage C4d) avec une conservation de la fonction rénale (274, 275). Une autre circonstance d'observation de ce rejet humoral infraclinique est l'apparition de DSA *de novo* qui, de façon insidieuse en l'absence de toute manifestation clinique, va conduire au développement de lésions de rejet humoral.

Les rejets aigus humoraux cliniques et infracliniques aboutissent tous deux progressivement au développement du rejet chronique humoral. Les lésions inflammatoires de la microcirculation (capillarite glomérulaire et péri tubulaire) peuvent persister pendant plusieurs mois ou années si les DSA restent présents. Après un délai variable, elles aboutissent à des lésions chroniques qui sont associées au développement d'une protéinurie et au déclin, souvent irréversible, de la fonction rénale. Ces lésions chroniques histologiques associent à des degrés variables une altération des membranes basales glomérulaires appelée « glomérulopathie d'allogreffe » et/ou des capillaires péri tubulaires (270, 276), une accélération des lésions d'artériosclérose (277) et le développement d'une fibrose interstitielle et d'une atrophie tubulaire. Ces lésions, à l'inverse des lésions inflammatoires de la microcirculation, sont considérées comme irréversibles, et il apparaît aujourd'hui évident que les interventions thérapeutiques, pour pouvoir être efficaces, doivent être appliquées avant l'installation de ces lésions chroniques. En effet, le rôle prépondérant du rejet chronique humoral dans les pertes tardives de greffon rénal a été mis en évidence dans de nombreuses études (252, 278-280).

La figure 23 résume donc l'histoire naturelle du rejet humoral en transplantation rénale (269). L'existence de DSA préformés ou l'apparition de DSA *de novo* après transplantation activent le complément et l'endothélium. Dans certains cas, cette activation se manifeste par un épisode de rejet aigu humoral, dans d'autres cas par une progression infraclinique des

lésions histologiques. Après un certain temps d'évolution apparaissent des lésions irréversibles de rejet chronique humoral, conduisant au déclin de la fonction rénale.

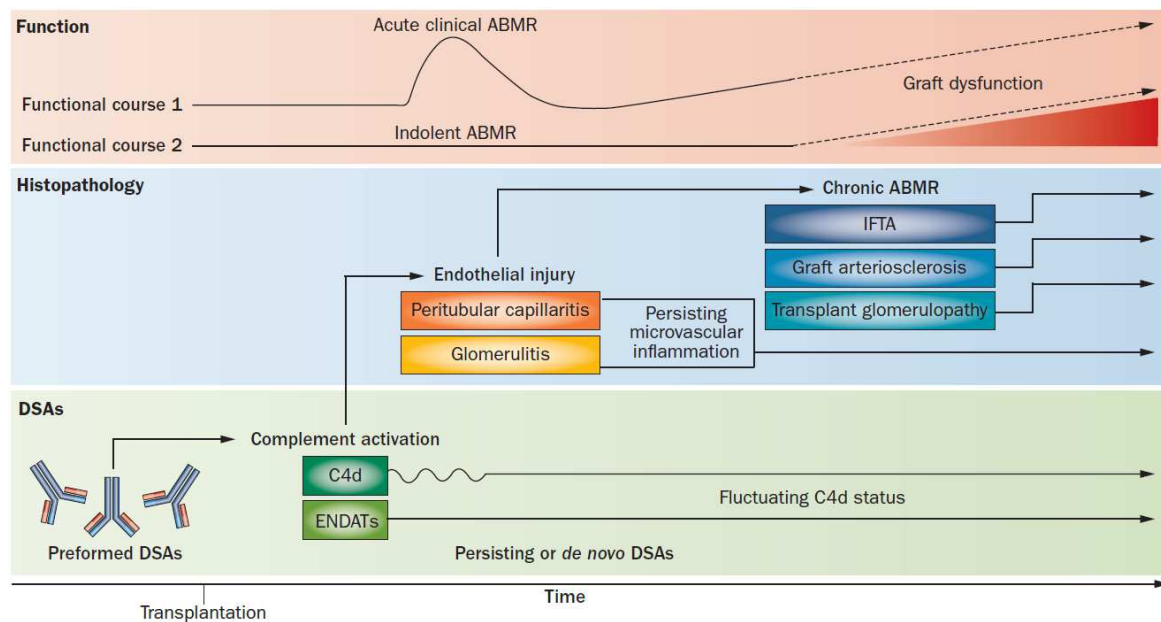


Figure 24 : Evolution naturelle du rejet humoral en transplantation rénale

D'après Loupy *et al.* ref [269]

En transplantation cardiaque, le rejet chronique se traduit par l'épaississement de l'intima des artères coronaires, encore appelée CAV (281-284). La CAV est une maladie complexe n'impliquant pas uniquement les DSA, d'autres facteurs immuns et non immuns ayant été incriminés (285-287).

En transplantation pulmonaire, l'agression chronique du greffon conduit principalement à une dysfonction chronique du greffon ou CLAD (*Chronic Lung Allograft Dysfunction*) qui peut évoluer sous un mode obstructif, c'est le BOS, ou restrictif, c'est le RAS (*Restrictive Allograft Syndrome*) (288, 289). La bronchiolite oblitérante est caractérisée un processus fibro-inflammatoire centré sur les bronchioles terminales aboutissant à l'oblitération totale de la lumière bronchique avec destruction des constituants de la paroi (290). La confirmation histologique du diagnostic est souvent difficile à obtenir, c'est pour cela que le BOS est diagnostiqué sur la base du déclin du volume expiratoire maximal par seconde (291).

En transplantation hépatique, peu de données existent concernant le rejet chronique humoral, notamment en raison du fait que les DSA en post-greffe sont rarement suivis. Une étude récente a comparé la survie de greffon entre des patients ayant des DSA avec une MFI supérieure à 10000 et ceux n'en ayant pas, tout en regardant les données histologiques. Plusieurs critères histologiques sembleraient décrire la présence d'un rejet chronique : la présence de signes d'inflammation au niveau lobulaire et interfaciale, une vénopathie porte, une augmentation du collagène au niveau porte et une fibrose subsinusoidale (292).

3.5 Traitement des rejets liés aux anticorps anti-HLA

Une action sur la réponse humorale allogénique est envisagée dans un certain nombre de situations telles que la prévention d'un rejet aigu humoral chez les patients ayant des DSA préformés (293), le traitement d'un rejet humoral aigu ou chronique lors de la formation de DSA de novo ou la persistance de DSA préformés (294). Plusieurs stratégies sont à ce jour utilisées, seules ou en association.

La première est de diminuer le taux de DSA dans le sérum en utilisant des échanges plasmatiques ou des colonnes d'immunoadsorption contenant de la protéine A (295-300). Ces méthodes n'ont pas pour vocation de diminuer la production des DSA et donc, après arrêt, une ré-augmentation du titre des DSA est inévitable, avec le risque de survenue de rejet humoral que cela implique (301).

D'autres traitements « symptomatiques » agissant sur l'activation du complément ont également été testés dans des cohortes de patients transplantés. Parmi eux, l'éculizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le facteur C5 de la cascade du complément, permettant de maîtriser le rejet humoral aigu mais pas le rejet chronique (302), et le C1-inhibiteur qui est encore en essai (303).

Nous l'aurons compris, afin de traiter de manière efficace les rejets humoraux, il est nécessaire de réduire la resynthèse des DSA. L'administration d'immunoglobulines intraveineuses est souvent associée aux traitements symptomatiques dans l'espoir d'atteindre ce but (295, 304, 305). De nombreux mécanismes régulateurs de la réponse humorale leur sont attribués (306). Un autre agent thérapeutique serait capable de diminuer le risque de resynthèse des DSA, il s'agit du rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20 ciblant les lymphocytes B et entraînant leur déplétion (307-309).

Aucune des thérapies citées ci-dessus ne permet une déplétion des plasmocytes à longue durée de vie. C'est ici qu'intervient l'introduction du bortezomib dans l'arsenal thérapeutique des transplantés. Cette molécule est un inhibiteur du protéasome et a été décrite comme pouvant entraîner l'apoptose de plasmocytes producteurs d'anticorps anti-HLA (310-313).

Ainsi, les thérapies utilisées contre le rejet humoral n'ont pas encore montré d'efficacité suffisante, ou du moins implacable, et une meilleure compréhension du mode de production des DSA et de leurs propriétés permettra peut-être d'avancer vers de nouvelles thérapies.

3.6 Anticorps anti-HLA : techniques de détection

3.6.1 La microlymphocytotoxicité

La technique historique d'identification des anticorps anti-HLA est la LCT (146). Elle consiste à mettre le sérum à tester en présence d'un panel de lymphocytes B et T de typage HLA connu, et de complément de lapin. La mortalité cellulaire causée par les anticorps anti-HLA est ensuite évaluée à l'aide de colorants vitaux, par exemple le bromure d'éthidium et l'acridine orange, une réaction positive étant définie par une lyse cellulaire supérieure à 20%. L'adjonction de dithiothréitol (DTT) au sérum permet de différencier la lyse liée à des IgM ou des IgG, cet agent réduisant les ponts disulfures qui permettent la pentamérisation des IgM, condition *sine qua non* pour qu'elles activent le complément. A noter que le panel de cellules utilisé est choisi pour représenter le plus fidèlement possible la répartition des typages HLA au sein de la population locale. Le pourcentage de lymphocytes lysés par rapport au nombre total de lymphocytes utilisés, ou *panel reactive antibodies* (PRA), reflète la difficulté de greffer un patient puisqu'il représente la largeur d'immunisation vis-à-vis des donneurs potentiels.

La LCT peut également être utilisée en urgence pour réaliser le test ultime de compatibilité donneur/receveur avant transplantation. Ce sont les lymphocytes en provenance des ganglions, de la rate ou du sang du donneur qui sont mis en présence de plusieurs sérums du receveur, choisis en fonction de l'historique immunologique du patient. La signification péjorative d'un XM LCT positif en transplantation rénale a été décrite pour la première fois en 1969 par Patel et Terasaki (146). Un XM LCT positif sur le sérum du jour de la greffe est une contre-indication absolue en raison du risque de rejet hyperaigu, alors que dans certains cas un XM LCT positif sur sérum historique peut être accepté chez certains patients hyperimmunisés, à partir du moment où un protocole thérapeutique adapté est mis en place (314-316).

La LCT présente un certain nombre d'avantages et à ce titre reste la technique de référence pour de nombreux laboratoires (317), notamment pour le XM. En effet, c'est un test fonctionnel permettant d'identifier des anticorps capables d'activer le complément donc hautement pathogènes, détectant les anticorps anti-HLA et non anti-HLA dirigés contre les lymphocytes d'un donneur et séparant les réactivités de type IgG et IgM, ce à moindre coût.

Cependant ses limites sont nombreuses : par définition, la LCT ne détecte que les anticorps capables d'activer le complément, et plus précisément ceux qui sont présents en quantité suffisante pour entraîner une lyse des lymphocytes. Elle manque donc cruellement de sensibilité et ne détecte pas tous les anticorps capables d'activer le complément *in vivo*, ni ne détecte les anticorps n'activant pas le complément mais pouvant tout de même avoir un effet pathogène. La sensibilité de la LCT a été augmentée en ajoutant un anticorps anti-IgG humaine aux lymphocytes et au sérum (AHG-CDC pour *anti-human globulin - cell dependent cytotoxicity*), ce qui permettait également de mettre en évidence les anticorps ne fixant pas le complément. Cependant, cette technique est difficilement utilisable avec les lymphocytes B du fait de la présence à leur surface d'immunoglobulines et de récepteurs aux fragments FcγR. La LCT souffre également d'un manque de standardisation, chaque laboratoire « cultivant » son propre panel, et il est souvent impossible de déterminer avec précision les antigènes HLA ciblés par les anticorps, notamment ceux de classe II, même si une adsorption des sérums sur pool de plaquettes (riches en HLA de classe I) permet parfois de pallier ce problème.

3.6.2 Le crossmatch par cytométrie en flux

Dans les années 80, les techniques de CMF ont été développées pour pallier les inconvénients de la LCT. Utilisées pour tester la présence d'anticorps dirigé contre les lymphocytes sans avoir recours à l'utilisation du complément (318), elles ont rapidement été abandonnées car l'utilisation de panels de lymphocytes était beaucoup plus lourde qu'avec la LCT. En revanche, le XM CMF est lui assez largement répandu et permet de jouir d'une meilleure sensibilité le jour de la greffe. Comme pour le XM LCT, il consiste en la mise en présence d'une suspension de lymphocytes en provenance du donneur avec les sérums du receveur. Les lymphocytes sont ensuite lavés et incubés avec un panel d'anticorps conjugués à des fluorochromes permettant de différencier les lymphocytes T (anti-CD3), les lymphocytes B (anti-CD19) parmi les leucocytes (anti-CD45), et les lymphocytes ayant été reconnus par des anticorps du receveur (anti-IgG et anti-IgM). La valeur pronostique péjorative d'une transplantation avec un XM CMF positif a clairement été mise en évidence, les patients transplantés avec un XM CMF positif mais un XM LCT négatif ayant un plus grand risque de rejet aigu humoral que des patients sans DSA et dont le XM CMF était négatif (218).

3.6.3 Les techniques ELISA

L'ELISA est une technique en phase solide très largement répandue et aux applications multiples. En histocompatibilité, elle consiste en l'adsorption de molécules HLA purifiées, en provenance de différentes sources en fonction du format, au fond de plaques 96 puits en polystyrène (319, 320). Lorsque des IgG anti-HLA sont présentes dans le sérum, elles se lient aux antigènes fixés au fond des puits dont elles sont spécifiques. Après une phase de lavage vient la phase de réaction avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à une enzyme qui permettra la révélation des réactions positive via une réaction colorée par la transformation d'un substrat. L'analyse via un lecteur de densité optique permet de donner une appréciation quantitative des anticorps fixés. Plusieurs formats existent : dépistage (mélange de molécules HLA en provenance de plusieurs cellules dans chacun des puits), panel (mélange de molécules HLA en provenance d'une seule cellule par puits) et *Single Antigen* (un seul antigène HLA par puits, produit par des lignées cellulaires n'exprimant qu'un seul antigène HLA).

En comparaison à la LCT, les techniques ELISA possèdent de nombreux avantages : elles permettent une identification antigénique de haute définition, rapide, automatisable, standardisée, et jouissent d'une meilleure sensibilité que la LCT. Cependant, elles possèdent des inconvénients imputables à toutes les techniques en phase solide : coût des réactifs, test de liaison ne déterminant pas le caractère pathogène des anticorps et donc associé à un excès de sensibilité, temps de réalisation important rendant la technique difficile à utiliser en urgence, absence de détection des anticorps anti-donneur non dirigés contre le HLA. A noter que cette méthode est actuellement supplantée par les techniques en format Luminex® qui permettent d'analyser le sérum d'un nombre plus important de patients dans un temps plus court.

3.6.4 La technologie Luminex®

Leur principe est très proche de celui de la technique ELISA, la seule différence étant que les antigènes HLA purifiés sont fixés sur des microsphères en polystyrène et pas au fond

de plaques 96 puits. Ces microsphères renferment un mélange précis de deux fluorochromes, une centaine de mélanges permettant de définir une centaine de numéros de billes différents. Après mise en présence du sérum à tester, la lecture des résultats se fait par un cytomètre dédié qui permet, à l'aide d'un premier laser, de séparer les billes en fonction de leur fluorescence propre, puis, à l'aide d'un deuxième laser, de déterminer une valeur de fluorescence liée à la présence d'IgG anti-HLA reconnues par un anticorps anti-IgG humaines couplé à la phycoérythrine. Comme pour l'ELISA trois formats existent (dépistage, panel et *Single Antigen*), mais le principal avantage des techniques en format Luminex[®] est qu'elles permettent de rechercher les anticorps anti-HLA de 96 patients sur une seule plaque, même en format *Single Antigen*, là où l'on ne peut tester qu'un seul patient par plaque en ELISA *Single Antigen*.

Les techniques *Single Antigen* Luminex[®] (SAG) sont rapidement devenues des méthodes de choix pour l'identification des anticorps anti-HLA en raison de leur sensibilité, résolution et côté pratique (321, 322). Elles ont permis une meilleure compréhension des rejets de greffe à médiation humorale, notamment par la détection d'anticorps anti-HLA qui ne l'étaient pas jusqu'alors (par manque de sensibilité ou de résolution) et d'anticorps dirigés contre des loci auparavant considérés comme non impliqués dans le rejet de greffe, tels que les anti-HLA-C, -DP ou chaîne alpha du DQ et DP. Par ailleurs, la représentation, pour certains antigènes et notamment en classe II, de plusieurs allèles dans les kits a permis de découvrir l'existence d'immunisations spécifiques d'allèles HLA. Par exemple, une situation assez fréquemment rencontrée est la présence d'une immunisation anti-HLA-A2 chez des patients portant un antigène HLA-A2, dès lors que celui-ci est A*02:05 et s'est immunisé contre du A*02:01, allèle HLA-A le plus fréquemment retrouvé dans la population. Néanmoins, ces techniques sont coûteuses et possèdent un certain nombre d'autres inconvénients qui seront discutés dans le chapitre suivant.

3.7 *Single Antigen* Luminex[®] : interprétation, limites et adaptations

3.7.1 Signification des MFI et seuils de décision

Le SAG mesure une intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour chaque bille, utilisée comme une valeur semi-quantitative de la « force » de l'anticorps. Au-delà du seuil de positivité biologique qui peut se définir à partir du bruit de fond moyen observé avec la technique, le seuil de positivité clinique n'est pas encore très bien défini. L'absence de matériau de référence, la disparité en termes de valeur de MFI obtenues dans les différents laboratoires d'histocompatibilité, et en fonction du fournisseur, ne facilitent pas cette tâche (323, 324).

En situation de pré-greffe, une MFI inférieure à 500 obtenue avec la technique One Lambda[®] a été choisie par l'Agence de la Biomédecine pour définir les « antigènes permis » lors de l'attribution des greffons rénaux, c'est-à-dire les antigènes contre lesquels nous pouvons considérer qu'un receveur ne possède aucune immunisation (« Le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés », Agence de la Biomédecine, année 2010). Par ailleurs, une MFI supérieure à 1000 est fréquemment utilisée par les laboratoires pour définir les « antigènes interdits », c'est-à-dire les antigènes contre lesquels nous pouvons considérer qu'un risque immunologique pour le patient est présent, avec une chance trop importante d'obtenir un XM CMF positif. Enfin, pour certains patients difficiles à transplanter en raison d'une immunisation anti-HLA trop large, certains centres

pratiquent des transplantations à risque immunologique plus élevé pour lesquelles, en général, une MFI maximum de 3000 est la limite à ne pas franchir. Dans de rares cas cela peut aller plus haut quand l'objectif est d'avoir un XM LCT négatif après désimmunisation. En effet, Lefaucheur et coll. ont décrit qu'un DSA préformé avec une $MFI > 465$ augmentait le risque de rejet aigu post-greffe, ce risque augmentant lorsque la MFI dépassait les 3000 avec un effet sur la survie du greffon (219). Une étude locale montrait également un risque accru avec une MFI supérieure à 500 (218), alors qu'une équipe suisse obtenait un seuil à 900 (325). Néanmoins, aucun de ces seuils n'est parfaitement associé à la survenue d'un rejet ou à la survie du greffon.

En situation post-greffe, la MFI des DSA *de novo* n'est pas non plus clairement associée à la survenue d'épisodes de rejet humoral ou de perte du greffon. Une étude récente a mis en relation la MFI et la perte du greffon rénal (326, 327). Des seuils de MFI associés à un plus fort risque de perte du greffon ont été proposés en transplantation rénale (supérieure à 6000) (328) et pulmonaire (supérieure à 10000) (264). Il semblerait également qu'une MFI plus élevée soit associée à la persistance des DSA *de novo* (125). A l'opposé, une étude réalisée sur une cohorte de transplantés cardiaques n'a pas démontré d'association entre la MFI et la perte du greffon (329).

3.7.2 Les interférences médicamenteuses

Parmi les traitements administrés aux patients transplantés, les sérums anti-lymphocytaires ont été décrits comme n'interférant que très peu avec le SAG (330). En revanche, l'administration d'immunoglobulines intraveineuses est connue comme entraînant une positivité de la quasi-totalité des billes présentes dans les tests, en raison de la présence, dans ces préparations, d'anticorps anti-HLA (331), ce qui gêne grandement l'interprétation des profils.

3.7.3 Les interférences négatives

Un certain nombre de travaux ont rapporté l'existence de réactions faussement négatives avec le SAG. Les premiers articles relataient une interférence réversible par un traitement du sérum au DTT ou bien via une dialyse hypotonique, laissant penser que ces interférences pouvaient être liées à des IgM anti-HLA entrant en compétition avec les IgG anti-HLA (332, 333).

Plus récemment une équipe allemande a décrit l'effet « prozone », appelé ainsi par homologie aux réactions d'agglutination car ne concernait que les anticorps de forte voire très forte MFI (334). Ces auteurs observaient une réversibilité de l'interférence par un traitement du sérum à l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), au DTT, à la chaleur (56°C pendant 30 min) ou par la dilution du sérum. Ces trois premiers traitements ayant en commun leur capacité de détruire le complexe C1, première molécule impliquée dans la voie classique du complément, l'hypothèse avancée concernant le mécanisme de cette interférence était que l'association du C1r et du C1s au C1q empêchait la fixation de l'anti-IgG fluorescent aux anticorps anti-HLA liés aux billes par un encombrement stérique (335), alors que le C1q seul, présent dans la condition EDTA, n'en était pas capable. Notre équipe a ensuite étudié cette interférence au sein d'une cohorte de patients immunisés anti-HLA et montré qu'elle pouvait expliquer les fluctuations de profil au cours du temps observées chez certains patients fortement immunisés (336).

3.7.4 Les antigènes dénaturés

Nous avons vu précédemment qu'il était possible de détecter des anticorps anti-HLA dans le sérum de sujets n'ayant jamais vécu d'évènement immunisant, et ce quelle que soit la technique utilisée. Néanmoins, ces anticorps anti-HLA « naturels » ont particulièrement alerté les cliniciens et biologistes en raison de la forte prévalence avec laquelle ils étaient observés en SAG : 63% classe I et classe II confondues dans une cohorte de 424 donneurs de sang (133) et 77% dans une cohorte de 534 patients en attente de transplantation rénale, avec un seuil de MFI = 1000 (337).

Dans la discussion de leur publication initiale, Morales-Buenrostro et coll. indiquaient qu'une partie de ces anticorps pouvaient reconnaître des molécules HLA de classe I de conformation anormale, en l'occurrence ayant perdu leur peptide et la B2M, lors des processus de purification et de fixation sur les billes (133). Leurs arguments reposaient sur les notions que 1) un certain nombre de ces anticorps voyaient leur MFI augmenter sur des billes traitées avec une solution acide (pH<3), condition connue comme dénaturant les molécules HLA de classe I (338, 339), et 2) la plupart d'entre eux n'étaient pas capables de positiver un XM CMF. En effet, les lymphocytes T et B n'expriment pas ou peu de molécules HLA de classe I sous cette forme dite *free-heavy chain* (FHC), sauf lorsqu'ils sont activés (340-342).

Un an plus tard, ces mêmes auteurs utilisaient le traitement acide dans la même cohorte afin de décrire un certain nombre d'épitopes pouvant être reconnus par les anticorps anti-HLA « naturels » de classe I. Certains étaient exposés à la surface des molécules HLA de classe I native et donc directement disponibles à la liaison par un anticorps « naturel » anti-HLA « natif » (anti-nHLA), alors que d'autres sont cryptiques, c'est-à-dire nécessitent une dénaturation de la molécule afin de devenir accessibles et constitueraient la cible des anticorps « naturels » anti-HLA « dénaturé » (anti-dHLA) (343).

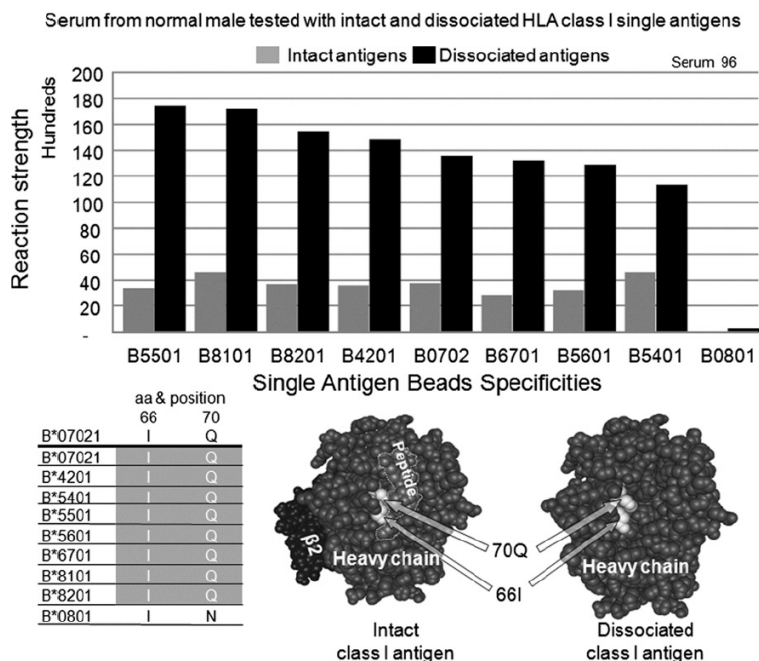


Figure 25 : Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I

D'après El-Awar *et al.* ref [343]

La signification clinique des anticorps anti-HLA « naturels » est encore débattue, mais la capacité de certains à reconnaître les molécules HLA natives devrait les faire considérer comme potentiellement pathogènes (344). En revanche, un certain nombre de cas rapportés et une étude en dépistage ont décrit les anticorps anti-dHLA, sous forme de DSA préformés, comme ne positivant pas les XM et n'ayant aucun impact clinique, suggérant que les anti-dHLA ne devraient pas être pris en compte dans les stratégies d'attribution des greffons (345-348). Cai et coll. ont récemment repris leur cohorte de patients transplantés rénaux, étudiés en dépistage en format Luminex[®], et évalué la capacité des anticorps anti-HLA dénaturé, définis par une nouvelle méthode de dénaturation (90°C pendant 5 minutes), à lier le C1q (349). Leurs résultats indiquaient que les anticorps anti-HLA dénaturé de classe I et II ayant la capacité de lier le C1q avaient un impact sur la survie du greffon. Néanmoins, leur approche est discutable, en particulier parce que l'utilisation des billes de dépistage ne permet pas de définir si les patients avaient des anticorps dirigés contre le donneur.

Afin de pallier ce problème de détection des anti-dHLA, le fabricant One Lambda[®] a proposé un nouveau réactif, les iBeads[®], constitué par des billes SAG classe I ayant subi des traitements enzymatiques permettant de retirer tout ou partie des molécules HLA dénaturées de leur surface, qui devaient alors ne pas détecter les anti-dHLA. Celles-ci ont été testées dans quelques études et donnaient des résultats encourageants, c'est-à-dire permettaient de mieux identifier les anticorps ayant une signification clinique (350).

3.7.5 Classes et sous-classes d'immunoglobulines

L'utilisation de conjugués spécifiques a permis d'étudier les sous-classes des IgG anti-HLA et également d'autres classes que les IgG, notamment les IgM et IgA anti-HLA.

Les études sur les sous-classes IgG montrent que les IgG1 sont présentes chez la quasi-totalité des patients (159, 160, 162-164). Par exemple, il a été récemment décrit, dans une cohorte de 51 patients présentant 138 anticorps anti-HLA de classe I et II, que seulement 12 (9%) de ces anticorps n'avaient pas de composante IgG1, dont 11 d'entre eux avaient une composante IgG3 (165). Ces résultats indiquent que la plupart des patients possèdent des IgG anti-HLA capables, en théorie, d'activer le complément. De plus, les auteurs observaient que la composition en sous-classes pouvait être influencée par le mode d'immunisation, les grossesses et pertes de greffons entraînant des immunisations composées de sous-classes multiples, et les transfusions des immunisations limitée aux IgG1. Au-delà des sous-classes IgG capables d'activer le complément, il a également été décrit que les DSA de la sous-classe IgG4 préformés étaient de mauvais pronostic en transplantation rénale (351). Ceci a été confirmé par une autre étude montrant que les DSA IgG4 détectés dans la première année post-transplantation étaient associés aux rejets humoraux infra-cliniques, par opposition aux IgG3 plutôt associées aux rejets aigus humoraux (166).

Les IgM anti-HLA ont été évoquées plus haut en tant qu'agents interférant avec la détection des IgG anti-HLA. Les quelques données existant dans la littérature ne démontrent pas clairement d'impact des IgM sur la survenue de rejet ou la survie du greffon (168, 352-354). Concernant les IgA, encore moins de données existent en SAG (355), et il a été suggéré que les IgA détectés en ELISA pouvaient avoir un rôle protecteur contre le rejet causé par les IgG (356, 357).

3.7.6 Activation et fixation du complément

Le test SAG a également été modifié afin de détecter les anticorps capables de fixer le C1q (169, 171), et de nombreuses études ont décrit une association entre la détection de DSA C1q+ et la survenue de rejet humoral ou la perte de greffon plus rapide (172, 254, 358-361). D'autres se sont intéressées à l'activation réelle du complément, c'est-à-dire aux dépôts de C4d (224, 362) et C3d (173) sur les billes, et sont parvenues aux mêmes conclusions.

Néanmoins, nous avons vu que la plupart des patients possèdent des IgG anti-HLA d'isotype IgG1 et/ou IgG3, et donc capables d'activer le complément, et il semble que la capacité de fixer ou activer le complément sur les billes du SAG dépende directement de la MFI des anticorps avec le SAG non modifié (161, 221, 334, 336, 359, 360, 363). Ainsi, la détection de DSA fixant/activant le complément pourrait n'être qu'une question de moindre sensibilité de ces tests, expliquant pourquoi des DSA fixant le complément seraient capable de générer un rejet plus rapide que les autres (254). Par ailleurs, nous ne savons pas si la densité et l'organisation des molécules HLA à la surface de billes sont comparables à celles présentes sur les cellules endothéliales du greffon. Si elles sont différentes, la capacité des DSA à entraîner des mécanismes de rejet liés au complément pourrait être sur- ou sous-estimée.

3.7.7 DSA intra-greffon

Le SAG permet également de détecter les DSA élués depuis les biopsies de greffon (gDSA pour *intragraft* DSA). Cette approche a été utilisée pour la première fois à partir de greffon explantés et des techniques de LCT (364, 365), puis avec des techniques plus sensibles telles que l'ELISA (366-368). Cette méthode est possible à partir de fragments de petite taille (102, 369) et notre équipe a récemment montré dans une cohorte de 51 transplantés rénaux ayant eu des biopsies sur indication que la présence de gDSA était corrélée à la présence de DSA dans le sérum, de lésions de la microcirculation et à la perte du greffon (370). Nous avons également pu suivre l'évolution des gDSA chez une patiente transplantée hépatique présentant des DSA préformés ayant engendré la perte du greffon (236). Il est important de noter que la plupart des gDSA, à quelques exceptions près, sont également présents dans le sérum, les DSA de forte MFI étant plus fréquemment retrouvés.

V – OBJECTIFS GENERAUX DE NOTRE TRAVAIL

Le principal problème actuel en transplantation d'organes solides est la survenue de rejets humoraux en relation avec la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur, qu'ils soient présents avant la transplantation ou n'apparaissant qu'après la transplantation. La prise de conscience de l'impact des DSA sur la survie du greffon a été possible, dans un premier temps, grâce au développement de molécules immunosuppressives ciblant l'immunité cellulaire, et dans un second temps par celui des techniques sensibles et résolutes que sont les techniques SAG. Ces techniques sont utilisées en mode semi-quantitatif, la MFI étant utilisée pour estimer la force des anticorps de classe IgG, le plus souvent présents dans le sérum des patients. Cependant, nous avons vu que les études cliniques ne montrent qu'une association imparfaite entre les événements cliniques et la MFI des DSA, ce pour différentes raisons.

Le premier objectif de notre travail a été d'améliorer la compréhension des différences entre les MFI observées avec le SAG et l'évolution clinique à travers l'exploration des causes de résultats faux positifs d'une part et faux négatifs d'autre part. Au total, 6 articles seront présentés. Les quatre premiers traitent des anticorps anti-HLA dénaturés de classe I (faux positifs) et les deux autres s'intéressent aux interférences négatives. Chaque article fera l'objet d'une introduction propre, et une discussion commune a été rédigée pour les articles de chacune des deux catégories.

Le deuxième objectif de notre travail a été d'étudier l'interaction des DSA avec le greffon. Nous avons tout d'abord recherché les DSA au sein d'éluats de biopsies obtenues chez des transplantés pulmonaires en utilisant l'approche précédemment citée pour les transplantés rénaux et hépatiques, c'est-à-dire en SAG. Néanmoins, le SAG étant une technique en point final, celui-ci ne reflète pas le mode d'interaction des DSA avec le greffon *in vivo*, et ne permet pas d'apprécier les constantes cinétiques d'interaction entre les DSA et leurs cibles, alors que ces propriétés pourraient influencer sur leur pathogénicité. Nous avons alors envisagé l'utilisation de la SPR pour déterminer la concentration et l'affinité des anticorps anti-HLA.

VI – Première partie : Anticorps anti-HLA
dénaturé de classe I

VI-1 – Premier article : Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I chez les patients en attente de transplantation rénale : prévalence, signification clinique et impact sur l’attribution des greffons

Article publié dans la revue *Transplantation*

« Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation »

Jonathan Visentin, Gwendaline Guidicelli, Thomas Bachelet, Christian Jacquelinet, Benoît Audry, Thoa Nong, Valérie Dubois, Jean-François Moreau, Jar-How Lee, Lionel Couzi, Pierre Merville and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

Cet article fait suite aux travaux publiés jusqu’alors au sujet des anti-dHLA de classe I, plus particulièrement décrits avec le réactif SAG proposé par la société One Lambda, Inc. que nous utilisons à Bordeaux. La définition d’un anti-dHLA n’était pas encore très claire, allant d’une MFI supérieure à 1000 dans la condition « traitement acide » (348, 350) à une relative augmentation de la MFI par rapport à la condition « non traité » (343), par opposition aux anti-nHLA voyant leur réactivité disparaître après traitement acide. La capacité des anti-dHLA à reconnaître des cellules normales, indiquant leur potentiel pathogène, n’était testée que dans un faible nombre de cas en XM CMF (133, 343, 345-347). Par ailleurs, l’utilisation des iBeads[®], proposées par One Lambda, Inc., n’était que très peu rapportée (350). Enfin, la prévalence des anti-dHLA au sein de la population des patients en attente de transplantation rénale n’était pas connue, ni l’impact négatif de ces anticorps sur l’accès à la greffe dans le cas où on les considérerait comme n’ayant pas de pouvoir pathogène. Ce travail a été initié dans le but de répondre à l’ensemble de ces questions.

Les sérums de 323 patients immunisés anti-HLA de classe I et en attente de transplantation rénale entre Janvier 2000 et Mars 2011 ont été envoyés chez One Lambda, Inc. Ils ont été testés en SAG classe I en conditions sans traitement et avec traitement à l’acide, ainsi qu’avec les iBeads[®] pour la plupart d’entre eux (Mrs Thoa Nong et Dr Jar-How Lee). Les tests en XM CMF ont été réalisés par les techniciennes de notre laboratoire HLA de routine à partir des cellules de donneurs d’organes consécutifs, la sélection des couples cellules/sérums étant réalisée par le biologiste d’astreinte au moment de la réalisation du XM prospectif pré-greffe auquel étai(en)t rajouté(s) le(s) sérum(s) sélectionné(s). La liste des antigènes A et B interdits avant et après retrait de ceux reconnus par des anti-dHLA a été envoyée à l’Agence de la Biomédecine aux Docteurs Benoît Audry et Christian Jacquelinet qui ont alors calculé les Taux de Greffons Incompatibles (TGI, nommé cPRA dans l’article) correspondant à ces patients.

Mon rôle dans cette étude a consisté en l’analyse statistique des données envoyées par One Lambda, Inc., ainsi que celles des XM CMF, la constitution des listes d’antigènes interdits envoyés à l’Agence de la Biomédecine, à réaliser une partie des choix des couples cellules/sérums à tester en XM CMF puis la rédaction de l’article. Une partie n’apparaissant pas dans la publication a également été d’étudier les profils des patients un à un afin de

déterminer les épitopes natifs ou cryptiques reconnus, sur la base de ce qui était alors décrit dans la littérature (88, 343).

Nous avons défini les anti-dHLA par une augmentation significative de leur MFI après traitement acide des billes ($D \geq 1,2N$). Ce seuil a été choisi en rapport avec la fidélité intermédiaire de la technique dans notre laboratoire. Les anti-dHLA étaient présents chez 39% des patients et représentaient 6% des billes positives observées (Figure 1, panel A). Le reste des billes étaient majoritairement reconnues par des anti-nHLA « prototypiques » (81%), c'est-à-dire des billes voyant leur MFI diminuer très fortement après traitement acide ($D \leq 0,2N$). Les 13% de billes restantes ont été considérées comme reconnues par des anti-nHLA intermédiaires ($1,2N > D > 0,2N$). Nous avons observé une variation importante des pourcentages de billes reconnues par des anti-dHLA en fonction des loci et des allèles considérés (exemples dans la Figure 1, panel B et Tables S1, S2, S3). Seulement 16% des anti-dHLA testés en XM CMF engendraient une positivité contre 83% des anti-nHLA (Figure 2). Le seuil de définition des anti-dHLA offrait une sensibilité (94%) et un rapport de vraisemblance négatif (0,10) satisfaisants. Les calculs de TGI avec et sans prise en compte des anti-dHLA montraient un impact considérable sur l'accès à la greffe pour un nombre non négligeable de patients, en particulier pour ceux ayant un TGI faible (inférieur à 20%) ou intermédiaire (entre 20 et 85%) (Figures 3 et 4). Les données obtenues avec les iBeads[®] ont été analysées pour les 111 sérums qui avaient été testés en XM CMF. Celles-ci montraient une bonne corrélation avec les données du traitement acide des billes ainsi qu'avec les résultats des XM CMF (Figure 5), et un seuil de MFI=1000 offrait une sensibilité (95%) et un rapport de vraisemblance négatif (0,10) satisfaisants.

**Title: Denatured class I Human Leukocyte Antigens Antibodies in
Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on
Organ Allocation**

Authors: Jonathan VISENTIN,^{1,2} Gwendaline GUIDICELLI,¹ Thomas BACHELET,² Christian JACQUELINET,³ Benoît AUDRY,³ Thoa NONG,⁴ Valérie DUBOIS,⁵ Jean-François MOREAU,^{1,2} Jar-How LEE,⁴ Lionel COUZI,⁶ Pierre MERVILLE,^{2,6} and Jean-Luc TAUPIN,^{1,2}.

¹CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France ; ² Université de Bordeaux, UMR CNRS 5164, Talence, France ; ³ CAgence de le biomédecine, Saint-Denis La Plaine, France, ⁴ One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA, ⁵ Laboratoire d'histocompatibilité, Etablissement Français du Sang, Lyon, France, ⁶ CHU de Bordeaux, Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France,;

Address for correspondence:

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France

Tel +33 5-57-82-08-84 / Fax +33 5-56-79-60-79

Email jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Conflict of interest:

T.N. and J.L. are employees of One Lambda Inc. The SAFB assays were performed in One Lambda's research department as a scientific collaboration, with reagents and equipments provided by One Lambda Inc and by staff people employed by One Lambda Inc.

The other authors declare no funding or conflicts of interest.

Abstract

Background. Single antigen flow beads assays may overestimate sensitization because of the detection of supposedly irrelevant antibodies recognizing denatured class I human leukocyte antigens (HLAs).

Methods. Sera of 323 HLA-sensitized kidney transplant candidates positive with a class I HLA single antigen flow beads assay were retested after acid treatment of the beads. Denatured HLA antibodies were identified according to ratio between the measured fluorescence intensity for treated and nontreated beads. T-lymphocyte flow cytometry crossmatches were performed to characterize the ability of these antibodies to recognize HLA on normal cells as a surrogate of their potential clinical relevance. Their impact on organ allocation was evaluated through a calculated panel reactive antibody. The utility of single antigen flow beads largely devoid of denatured HLA (iBeads) was also evaluated.

Results. Denatured HLA antibodies were detected in 39% of the patients. They provided much less positive flow cytometry crossmatches than anti-native HLA antibodies (16% vs. 83%, $P < 0.0001$). Removing the HLA-A and HLA-B antigens targeted by denatured HLA antibodies from unacceptable antigens lowered the calculated panel reactive antibody for 90 patients, sometimes dramatically. The iBeads assay demonstrated nearly the same ability to predict crossmatch results than the acid treatment assay.

Conclusion. Denatured class I HLA antibodies are common, but the antigens they target should not be considered as unacceptable in most cases, because they negatively impact access to a transplant while predominantly providing negative sensitive crossmatches. The iBeads assay seems to be a valuable alternative to better define unacceptable antigens.

Keywords: HLA antibodies, Denatured HLA antibodies, Transplant allocation, Kidney transplantation, iBeads.

Abbreviations:

anti-dHLA: anti-denatured HLA antibody(ies)

anti-nHLA: anti-native HLA antibody(ies)

cPRA: calculated panel reactive antibody

dHLA: denatured class I HLA

FCXM: flow cytometry crossmatch

FHC: free class I HLA heavy chains

MCS: mean channel shift

MFI: mean fluorescence intensity

nHLA: native class I HLA

SAFB: single antigen flow bead(s)

Introduction

The single antigen flow beads (SAFB) assays permit exhaustive identification of alloantibody specificities for human leukocyte antigens (HLAs), allowing anticipating the result of pretransplant crossmatches and rationally improving organ allocation through selection of sensitized recipients with the least chance of a positive crossmatch contraindicating the transplant (1, 2). However, besides native HLA molecules (nHLA), expected to be recognized by serum anti-nHLA antibodies (anti-nHLA), class I HLA SAFB also display on their surface denatured HLA molecules (dHLA), that is, free class I HLA heavy chains (FHC) dissociated from A2-microglobulin and peptide (3, 4). The dHLA molecule has a different epitope composition from the native one, because the HLA molecule > helices, harboring most polymorphic residues responsible for allogenicity, undergo conformational changes on peptide binding or release (5-12). The SAFB acid treatment also dissociates class I HLA heterotrimers (4), and for many anti-nHLA, binding ability (i.e., mean fluorescence intensity [MFI] with SAFB assay) to treated beads is drastically decreased because of the denaturation of target acidsensitive conformational epitopes (13, 14). Other epitopes are acid-resistant and remain well recognized by anti-nHLA after SAFB acid treatment (4). Finally, dHLA also displays specific epitopes, often cryptic on nHLA, which are recognized by anti-dHLA antibodies (anti-dHLA) and were characterized by an MFI increase after acid treatment (4).

Anti-dHLA are currently not distinguished from antinHLA, and their HLA targets are indiscriminately considered as unacceptable for organ allocation. However, their relevance might be reconsidered if they were proved unable to bind HLA molecules on donor cells.

Flow cytometry crossmatch (FCXM) is a highly sensitive assay for detecting antibodies capable of interacting with an antigen naturally expressed by donor cells, be it correctly conformed or not. Flow cytometry crossmatch positivity strongly suggests that such antibodies are potentially pathogenic. Interestingly, a few case reports suggest for a few HLA

antigens that anti-dHLA do not bind cell surface HLA (3, 15-17). Accordingly, using a Luminex screening assay in kidney transplant recipients, anti-dHLA have been described as not detrimental to graft function, in contrast to anti-nHLA (13). A new SAFB reagent largely devoid of denatured class I HLA antigens through enzymatic treatments (iBeads; One Lambda Inc., Canoga Park, CA) recently became available and was suggested to distinguish clinically relevant DSA (i.e., iBeads-positive) from clinically irrelevant ones (i.e., iBeads-negative) in a retrospective cohort study of 156 kidney transplant recipients with preformed SAFB-positive DSA (14). However, no sensitive cell-based assay, such as FCXM, was used to verify that the supposed irrelevant DSA were indeed unable to recognize cell surface HLA. The objectives of the present monocentric retrospective study were therefore to describe anti-dHLA in a cohort of 323 class I HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant, through (1) estimating the allele-per-allele prevalence of anti-dHLA using acid treatment of the SAFB, (2) determining cell membrane HLA recognition with FCXM, (3) estimating their impact on calculated panel reactive antibody (cPRA), an indicator of transplant access, and (4) evaluating the iBeads as an alternative to better characterize unacceptable antigens.

Results

Prevalence and Description of Class I Anti-dHLA Antibodies in Sensitized Recipients

The SAFB distribution of the reactivity against each bead (or allele) for the 323 sera in denaturing (D) and non-treated (N) conditions is described in Figure 1(A). The beads were classified according to the MFI ratio obtained between the D and N assays, as described in Materials and Methods. In the N condition, all samples were positive for at least one bead (median of 25 [quartiles, 11-46; range, 1-89]) and 9,524 beads (30.4% of the total 31,331) were positive (Tables S1, S2 and S3, respectively, for HLA-A, HLA-B, and HLA-C alleles tested and allele-per-allele distribution of positive beads). Comparison of MFI between D and N conditions identified 531 anti-dHLA ($D \geq 1.2N$: 6%, from 126 patients), 7,731 prototypical anti-nHLA ($D \leq 0.2N$: 81%, from 305 patients) and 1,262 intermediate anti-nHLA ($1.2N \geq D \geq 0.2N$: 13%, from 211 patients). Anti-dHLA displayed a strong MFI increase after acid treatment, with $D \geq 1.6N$ in 69% of cases (Table S4). Anti-dHLA were similarly detected with three SAFB lots (Table S5, for 40 sera tested in routine in N condition before study), running out lot-to-lot variation in the occurrence of this phenomenon. Previously transplanted patients displayed more positive beads (median, 31 [quartiles, 15-53; range, 1-89] versus 14 [quartiles, 6-34; range, 1-79], $P < 0.001$). Presence of anti-dHLA was independent from previous allograft ($P = 0.49$), transfusion ($P = 0.36$), pregnancy ($P = 0.48$), and patient sex ($P = 0.41$). Anti-dHLA frequency was radically different between HLA-A, HLA-B, and HLA-Cw alleles taken individually (Tables S1, S2 and S3). As examples, the four most and less frequently involved HLA-A and HLA-B alleles are shown in Figure 1(B). Anti-dHLA were more frequent among HLA-Cw (median, 10.3% [quartiles, 7.1-12.6; range, 1.8-15.9]), than among HLA-A (median, 5.3% [quartiles, 2.6-8.5; range, 1.1-17.2]) and HLA-B alleles (median, 3.6% [quartiles, 2.4-5.5; range, 0-15.8]) ($P < 0.05$). The MFI values in N condition

were lower for anti-dHLA than those for anti-nHLA (median, 2,288 [quartiles, 1,446-4,773; range, 1,001-15,801] and 5,961 [quartiles, 2,472-11,733; range, 1,000-24,939], $P<0.0001$).

FCXM Reactivity of Anti-dHLA Antibodies

With lymphocytes from 63 organ donors, 219 T-lymphocyte FCXM assays were performed with 111 different sera where a unique unacceptable HLA-A, HLA-B, or HLACw donor antigen was recognized by an anti-dHLA ($n=62$) or an anti-nHLA ($n=157$). Twenty-four and 34 different antigenic specificities (12/12/0 and 12/21/1 for HLA-A, HLA-B, and HLA-Cw, respectively) were tested with 30 and 86 sera, respectively. A serum could be tested against several different antigens (median, 2; range, 1-6) but only once against any given one. Only 10 (16%) anti-dHLA provided a positive FCXM versus 130 (83%) anti-nHLA ($P<0.0001$). Although SAFB MFI in N condition was lower for anti-dHLA (median, 5,740 [quartiles, 3,117-8,991; range, 2,088-12,779] vs. 9,411 (quartiles, 5,169-12,833; range, 2,098-21,900)) than for anti-nHLA ($P<0.0001$), stratifying according to SAFB MFI strength confirmed that anti-dHLA with an MFI of 3,000 or greater in N condition provided less positive crossmatches than anti-nHLA ($P<0.0001$), with a trend for lower MFI (2,000-3,000) (Tables S6 and S7). The SAFB MFI and FCXM mean channel shift (MCS) were significantly correlated for anti-nHLA ($\rho=0.76$, $P<0.0001$) but not for anti-dHLA ($\rho=0.06$, $P=0.65$) (Fig. 2). Hence, the primarily defined $D\geq 1.2N$ threshold efficiently distinguished antibodies able to provide a positive FCXM, with 94% sensitivity, 66% specificity, 83% and 84% positive and negative predictive values, and 2.74 and 0.10 positive and negative likelihood ratios.

Impact of Anti-dHLA on Transplant Access

Among the 323 patients, 130 (40%) were highly sensitized ($\text{cPRA} \geq 85\%$) and 12 displayed a $\text{cPRA} = 0$ against HLA-A and HLA-B antigens (Cw being not considered by the allocation program) because they were sensitized against rare antigens only ($n=9$) or against rare allelic specificities ($n=3$). We calculated a corrected cPRA, by removing from unacceptable antigens the HLA-A and HLA-B specificities recognized by anti-dHLA. Ninety-six patients (29.7%) were concerned (Fig. 3). The cPRA decreased for 90 (93.7%) of them. Absolute median cPRA decrease was 5% (quartiles, 1-14; range, 0-67) but was more important for patients with weak ($n=18$, basal $\text{cPRA} < 20\%$) or intermediate ($n=49$, $85\% > \text{basal cPRA} \geq 20\%$) versus high ($n=29$, $\text{cPRA} \geq 85\%$) sensitization: 10% (quartiles, 2-15; range, 0-16) and 11% (quartiles, 2-26; range, 0-67) versus 1% (quartiles, 0-4; range, 0-53), respectively ($P < 0.05$) (Fig. 4, top). This corresponded to a median relative decrease of 94.7% (quartiles, 35-100; range, 0-100) and 17.6% (quartiles, 3-72; range, 0-100) versus 1% (quartiles, 0-4; range, 0-61), respectively ($P < 0.05$) (Fig. 4, bottom). For the nine patients with only anti-dHLA, the median basal cPRA dropped from 15% (quartiles, 9-51; range, 3-67) down to zero after correction.

The iBeads Assay as a Valuable Alternative to Predict FCXM Crossmatch Results

The 111 FCXM sera were tested with iBeads and represented 32.0% of the beads found positive with the non-treated SAFB assay (296 [8.6%] anti-dHLA and 3,145 [91.4%] anti-nHLA). Among them, 2,886 (83.9%) were positive with iBeads (2,802 [97.1%] anti-nHLA and 84 [2.9%] anti-dHLA) and 555 (16.1%) were negative (343 [61.8%] anti-nHLA and 212 [38.2%] anti-dHLA). Hence, negative iBeads were significantly more frequent among anti-dHLA than among anti-nHLA (212 [72%] vs. 343 [11%], $P < 0.0001$). The iBeads-negative anti-dHLA showed higher non-treated SAFB MFI than iBeads-negative anti-nHLA (median, 2,367 [quartiles, 1,501-4,572; range, 1,001-11,617] vs. 1,405 [quartiles, 1,169-1,932; range, 1,002-12,940], $P < 0.0001$). Correlation between iBeads MFI values and FCXM MCS values

($\rho=0.829$, $P<0.0001$) (Fig. 5) was stronger than that with non-treated SAFB assay (Fig. 2). Only 7 (14%) specificities among 49 with iBeads MFI less than 1,000 versus 133 (78%) among 170 with an MFI of 1,000 or greater provided a positive FCXM. Hence, an iBeads MFI threshold of 1,000 was accurate to distinguish antibodies able to provide a positive FCXM with 95% sensitivity, 53% specificity, 78% and 86% positive and negative predictive values, and 2.03 and 0.10 positive and negative likelihood ratios.

Discussion

We report using a large cohort of class I HLA sensitized kidney awaiting patients the high prevalence of anti-dHLA antibodies (39% of patients), confirming and extending previous results based on a flow bead screening assay (13). We also describe the wide range of class I HLA alleles targeted by anti-dHLA, with a higher frequency for HLA-Cw, and important disparities among A and B alleles. This heterogeneity is not yet fully explained, but could be attributed to a variable number of epitopes shared between triggers of the anti-dHLA repertoire and selective dHLA alleles (18-22). Likewise, we unequivocally demonstrate that anti-dHLA yielded positive FCXM drastically less frequently than anti-nHLA, and that SAFB and FCXM were correlated for anti-nHLA but not for anti-dHLA. This confirms that anti-dHLA usually do not recognize cell-bound HLA alleles, and therefore should not be deleterious, although a recent metaanalysis reported that DSA detected only with solid phase assays still increased the risk of antibody mediated rejection and graft failure (23). Interestingly, in line with our findings, we did not observe any rejection episode among the seven patients from the present study who were transplanted with preformed anti-dHLA DSA only, and their 5-year graft survival was comparable to nonsensitized recipients (Visentin et al., submitted for publication). Noteworthy, anti-dHLA could, in some cases, provide positive FCXM. A possible explanation is that a serum can contain mixtures of anti-nHLA and anti-dHLA reactivities targeting the same allele. If reactivity against nHLA is weaker than against dHLA, loss of anti-nHLA reactivity after acid treatment could be masked by the increased anti-dHLA reactivity; hence, the allele could be erroneously tagged as targeted by an anti-dHLA only. Such antibody mixtures could alternatively lead to intermediate anti-nHLA if anti-dHLA reactivity is equal to or lower than the anti-nHLA one. Experiments are underway to confirm this hypothesis.

It is known that activated B and T lymphocytes can naturally express low levels of class I HLA FHC (24-26). If FHC are also expressed in sufficient amount by the transplant's endothelial cells after cold ischemia-reperfusion injuries, they could become targets for anti-dHLA, rendering them potentially pathogenic. To date, FHC expression by endothelial cells has not been described and pretransplant anti-dHLA, by contrast to anti-nHLA, are not deleterious according to the few case reports published (13, 15-17), to the recent large retrospective study (14) and to our posttransplant study (Visentin et al., submitted for publication). Currently, antigens recognized by anti-dHLA are declared unacceptable because the classic SAFB assay does not discriminate them from anti-nHLA. As anti-dHLA can recognize frequent donor HLA-A and HLA-B alleles (e.g., A*01:01, A*11:01, A*24:02, B*08:01, B*40:01, B*44:02; Tables S1 and S2), we found that the patient's cPRA can be significantly overestimated, causing a non-negligible decreased access to a compatible donor. The cPRA decrease was higher for the intermediately sensitized recipients, who do not benefit from national priority programs despite limited access to a transplant. The lowest impact, observed for the highly sensitized recipients, could be explained by a too rich allogenic immune history having built up a large and strong anti-nHLA response masking the anti-dHLA sensitization existing toward the same antigens. Furthermore, anti-HLA-Cw can be pathogenic (27, 28) and may contraindicate transplantation, depending on local policies. However, C-locus is not considered in cPRA calculation, although it was the most frequent target of anti-dHLA in our study, especially for common alleles (C*04:01, C*05:01, C*06:02, C*07:02; Table S3). Therefore, the real impact of anti-dHLA on transplant access could be even more significant. The new iBeads SAFB reagent was recently shown in a clinical study to better distinguish pathogenic DSA than classic SAFB (14). Our results strengthen this message by demonstrating that iBeads are more selective toward antibodies able to trigger FCXM positivity. However, iBeads appeared not strictly specific for anti-nHLA because they could still detect FCXM-negative anti-HLA in some cases, not explained by bead MFI value

nor by peculiar antigenic specificities (results not shown). Moreover, some FCXM positive anti-nHLA were iBeads-negative, but iBeads may display a lower density of HLA than the classic SAFB (14), and therefore might be less sensitive.

Our study is monocentric and relies on local definitions for anti-dHLA, with FCXM and SAFB assays positivity thresholds based on our own experience, in the absence of consensus. Nevertheless, these results plead for a reassessment of the SAFB assay results because the MFI values generated should not be taken at face value, as was recently emphasized by the International Antibody Consensus Group (29), and can possibly explain some of its discrepancies with transplant outcome (30). Being closer to the FCXM, the iBeads assay might be a suitable alternative to the classic SAFB, once thresholds for permissible and unacceptable antigens will have been reassessed with larger crossmatching and clinical studies.

Materials and Methods

Patients, Donors, and Sera

All the 336 class I HLA-sensitized patients enrolled on our adult kidney waiting list between January 2000 and March 1, 2011, were eligible, but 13 were excluded because of high background in SAFB assay. The final study group included 163 women and 160 men, among whom 294 (91%, with 136 [85%] men and 158 [97%] women) had faced at least one sensitizing event such as transplantation (70 [43%] and 125 [78%]), transfusion (91 [56%] and 90 [56%]) or pregnancy (118 [72%]). Among them, 215 (67%) were also class II sensitized. One pretransplant serum was studied for each patient, chosen at a class I sensitization peak as defined by complement dependent cytotoxicity PRA, Luminex PRA or Luminex SAFB assays, for patients transplanted between 2000 and 2004, 2005 and 2008, and 2009 and February 2011, respectively, and at a peak Luminex SAFB assay for the patients still awaiting a transplant on March 1, 2011. Low-resolution and high-resolution (when required) donor HLA-A, HLA-B, and HLA-C typing was performed with DNA techniques (respectively, Olerup SSP; Stockholm, Sweden, and High Resolution Labtype SSO; One Lambda, Inc., Canoga Park, CA).

Definition of Anti-dHLA and Anti-nHLA Antibodies With SAFB Assays

Sera were tested retrospectively with classic SAFB (lot 006) in N condition and iBeads (lot 001) (One Lambda, Inc.) according to manufacturer's recommendations for routine assay use. Both assays explore the same 97 HLA-A, B and C alleles (listed in Tables S1 to S3, respectively). The MFI values were normalized using the baseline formula (Fusion software; One Lambda, Inc.). Our local pretransplant positivity threshold defining unacceptable antigens was applied ($\text{MFI} \geq 1,000$). Denaturation of classic SAFB was performed by preincubating the beads for 30 min with 0.1 M glycine buffer containing 1% bovine serum

albumin (pH=2.5), followed by three washes with the SAFB washing buffer. The assay was then performed exactly as for the N condition. Samples with high background in any of the assays, that is, providing raw MFI above 500 with negative control bead were not considered in the study. Consistency of denaturation was ascertained with a positive control serum containing only anti-nHLA (Figure S1). The maximum variation coefficient of interassay variability observed in our laboratory is approximately 20% for normalized MFI values above 500 (data not shown); hence, we considered as significant a MFI increase after acid-induced denaturation (D) of ≥ 1.2 times the N condition MFI. Therefore, we classified beads into three categories according to MFI ratio between the D and N conditions. Those with a reactivity increase after acid treatment ($D \geq 1.2N$) were considered as recognized by anti-dHLA. The others were considered as recognized by anti-nHLA, and subdivided into prototypical anti-nHLA for those with an arbitrarily set drastic MFI decrease after acid treatment ($D \leq 0.2N$), and intermediate anti-nHLA for those with a moderately decreased or a stable MFI after acid treatment ($1.2N > D > 0.2N$).

T-lymphocyte FCXM Assay

The FCXM was performed on freshly drawn total lymph node or spleen mononuclear cells from consecutive deceased organ donors tested for compatibility with our wait-list patients, with the routine four-color staining protocol previously described (31). Sera were selected to react with nontreated SAFB against only one unacceptable HLA-A, HLA-B or HLA-Cw donor antigen, with a MFI of 2,000 or greater as in our experience FCXM are frequently negative below this value. The positivity threshold for T lymphocytes was at a MCS value of 50 above the negative control, which is a serum pool from AB group nonallosensitized donors.

Computing Class I cPRA Values

Unacceptable antigens are defined at MFI 1,000 for antigens represented by one allele with the classic SAFB in N condition. For two or more alleles, the decision relied on the allele frequently found in the white population (HLA-A*02:01, A*11:01, A*24:02, A*29:02, A*66:01, B*13:02, B*15:02, B*27:05, B*40:02, B*51:01, B*57:01). When more than one allele was common, all alleles had to reach an MFI of 1,000 (HLA-A30, A33, A34, A68, B44, Cw10). The national organ allocation CRISTAL software (Agence de la Biomédecine, Saint-Denis-La-Plaine, France) infers the recipient's cPRA (i.e., the percentage of donors expressing at least one unacceptable antigen), from HLA-A, HLA-B, HLA-DR, and HLA-DQ frequencies observed in the French ABO-matched donor population over the previous 5 years. The basal cPRA is computed from the SAFB assay in N condition. The corrected cPRA was obtained after removal of the specificities reacting with anti-dHLA.

Statistical Analysis

Descriptive statistics used mean (standard deviation), median, first or third quartiles and range; study of qualitative variables used the two-tailed chi-square test or the Fisher's exact test, when appropriate, and independent quantitative variables the two-tailed Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison of subgroups according to Conover. Degree of relationship between variables was calculated using Spearman's coefficient of rank correlation Q. Analyses were performed with MedCalc software (Mariakerke, Belgium).

Acknowledgments

The authors thank Catherine Rio, transplant coordinator nurse, for her valued assistance. The authors also thank the technicians of the immunology laboratory for their technical expertise.

References

1. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, et al. Transplanting the highly sensitized patient: the emory algorithm. *Am J Transplant* 2006; 6: 2307.
2. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, et al. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am J Transplant* 2011; 11: 719.
3. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, et al. “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111.
4. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009; 70: 844.
5. Springer S, Doring K, Skipper JC, et al. Fast association rates suggest a conformational change in the MHC class I molecule H-2Db upon peptide binding. *Biochemistry* 1998; 37: 3001.
6. Kurimoto E, Kuroki K, Yamaguchi Y, et al. Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form. *Mol Immunol* 2013; 55: 393.
7. Bouvier M, Wiley DC. Structural characterization of a soluble and partially folded class I major histocompatibility heavy chain/beta 2m heterodimer. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 377.
8. Zacharias M, Springer S. Conformational flexibility of the MHC class I alpha1-alpha2 domain in peptide bound and free states: a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 2004; 87: 2203.
9. Polakova K, Karpatova M, Russ G. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol* 1993; 30: 1223.

10. Perosa F, Luccarelli G, Prete M, et al. Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10- specific peptide. *J Immunol* 2003; 171: 1918.
11. Sumitran-Karuppan S, Moller E. Acid treatment of lymphocytes selectively decreases the expression of HLA class I antigens: a method to confirm that a positive clinical crossmatch test was due to class I antibodies. *Transpl Immunol* 1996; 4: 163.
12. Danliczyk UG, Delovitch TL. Beta 2-microglobulin induces a conformational change in an MHC class I H chain that occurs intracellularly and is maintained at the cell surface. *J Immunol* 1994; 153: 3533.
13. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, et al. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009; 88: 226.
14. OttenHG, VerhaarMC, BorstHP, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2013; 173: 536.
15. Jacob EK, De Goey SR, Gandhi MJ. Positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch results in two cases. *Transpl Immunol* 2011; 25: 77.
16. Nikaein A, El-Awar N, Hunt J, et al. Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31: 443.
17. Pereira S, Perkins S, Lee JH, et al. Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *HumImmunol* 2011; 72: 492.
18. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science* 1970; 168: 1095.
19. Hirata AA, McIntire FC, Terasaki PI, et al. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. *Transplantation* 1973; 15: 441.

20. Archer JR. Search for cross-reactivity between HLA B27 and *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Rheum Dis* 1981; 40: 400.
21. Gross U, Chen JH, Kono DH, et al. A ribosomal protein of *Yersinia pseudotuberculosis* having partial epitope identity with HLA-B27. *Autoimmunity* 1990; 7: 267.
22. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, et al. Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E-positive sera. *J Immunol* 2010; 185: 1935.
23. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 2061.
24. Schnabl E, Stockinger H, Majdic O, et al. Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2- microglobulin. *J Exp Med* 1990; 171: 1431.
25. Pickl WF, Holter W, Stockl J, et al. Expression of beta 2-microglobulin-free HLA class I alpha-chains on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. *Immunology* 1996; 88: 104.
26. Bodnar A, Bacso Z, Jenei A, et al. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 2003; 15: 331.
27. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011; 11: 1543.
28. Tran TH, Dohler B, Heinold A, et al. Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation* 2011; 92: 419.
29. Tait BD, Susal C, Gebel HM, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 19.

30. Susal C, Ovens J, Mahmoud K, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation* 2011; 91: 883.
31. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91: 527.

Figures legends

Figure 1: Distribution of HLA alleles according to MFI comparison between N and D SAFB assay conditions. (A) Sera from class I HLA-sensitized patients were tested in D (after acid treatment of the beads) and N (without acid treatment of the beads) conditions. Positive and negative alleles (one allele per bead) with nontreated SAFB (MFI, $N \geq 1000$ and $N < 1000$, respectively) were categorized according to the MFI ratio between D and N conditions. Number and percentage of alleles and sera are depicted for each category. *This category of beads/alleles found negative in N condition (MFI $N < 1000$) and positive de novo after acid treatment (MFI, $D \geq 1000$), will not be studied herein because the corresponding antigens are not considered as unacceptable for transplant. (B) Distribution of MFI values in N and D conditions for the 4 HLA-A and HLA-B alleles displaying anti-dHLA antibodies ($D \geq 1.2N$) the most (upper row of four graphs) and the least (lower row of 4 graphs). n notifies for each antigen the number of positive cases in N condition (MFI, $N \geq 1,000$). N, nontreated; D, denaturing; MFI, mean fluorescence intensity; SAFB, single-antigen flow beads, HLA, human leukocyte antigen.

Figure 2: Flow cytometry crossmatch analysis of anti-dHLA and anti-nHLA antibodies. Spearman's rank correlation between normalized SAFB MFI obtained in the N condition and MCS on single mismatch T-cell FCXM, for all anti-HLA (top), anti-dHLA ($D \geq 1.2N$, middle), and anti-nHLA ($D < 1.2N$, bottom). HLA, human leukocyte antigen; dHLA, denatured HLA; nHLA, native HLA; MCS, mean channel shift; FCXM, flow cytometry crossmatch; MFI, mean fluorescence intensity; SAFB, single antigen flow beads; D, denaturing; N, nontreated.

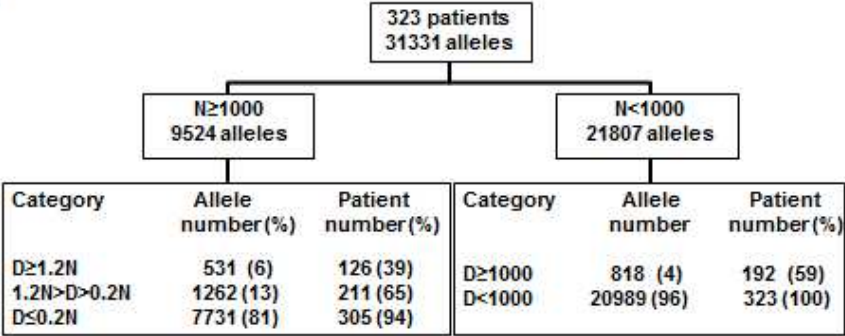
Figure 3: Impact of anti-dHLA antibodies on the cPRA. The CRISTAL cPRA values were calculated from the lists of unacceptable antigens obtained before (basal cPRA, empty triangles) and after (corrected cPRA, filled squares) removal of the HLA-A and HLA-B antigens targeted by the anti-dHLA antibodies ($D \geq 1.2N$) for the 96 patients in this situation. Patients are ranked by decreasing basal cPRA. cPRA, calculated panel-reactive antibody; HLA, human leukocyte antigen; dHLA, denatured HLA.

Figure 4: Impact of the anti-dHLA antibodies on the cPRA with respect to the level of sensitization. Absolute (top) and relative (bottom) decrease of the cPRA value due to the removal of the anti-dHLA antibodies ($D \geq 1.2N$) for the lowly ($<20\%$), intermediately ($20\%-85\%$), and highly ($\geq 85\%$) sensitized recipients. Median and the first and third quartiles (box), range (vertical line), and “outlier” values (dots). $*P < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison of subgroups according to Conover. cPRA, calculated panel reactive antibody; HLA, human leukocyte antigen; dHLA, denatured HLA.

Figure 5: Flow cytometry cross match analysis of anti-HLA antibodies identified with iBeads. Spearman’s rank correlation between normalized MFI obtained with iBeads and MCS on single mismatch T-cell FCXM. HLA, human leukocyte antigen; MFI, mean fluorescence intensity; FCXM, flow cytometry cross match; MCS, mean channel shift.

FIGURE 1

A



B

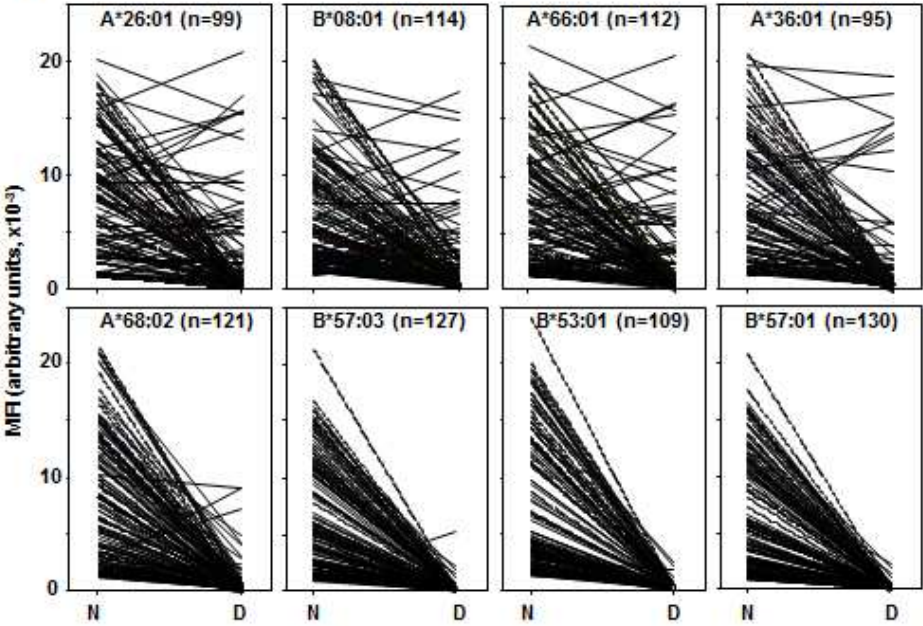


FIGURE 2

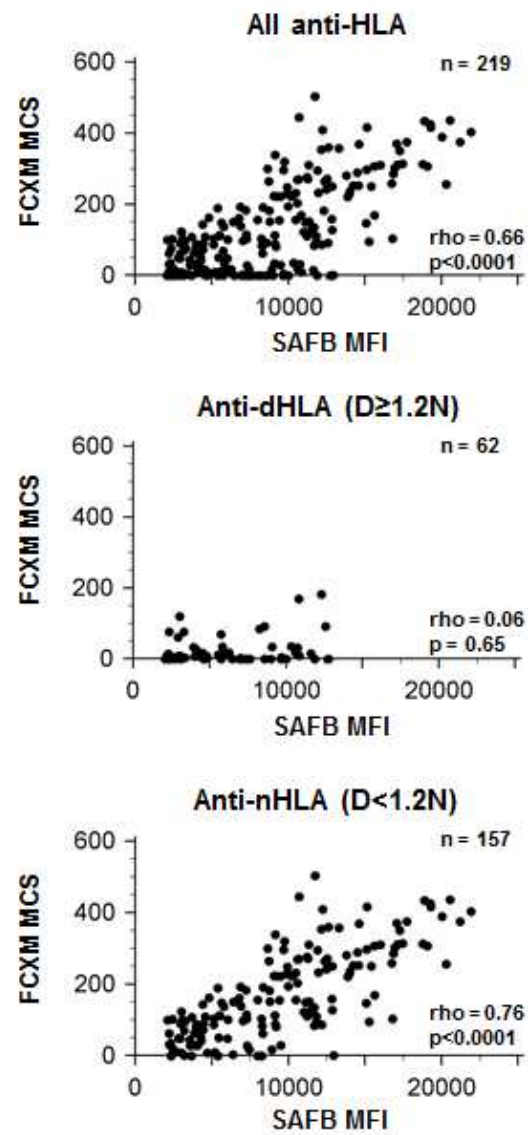


FIGURE 3

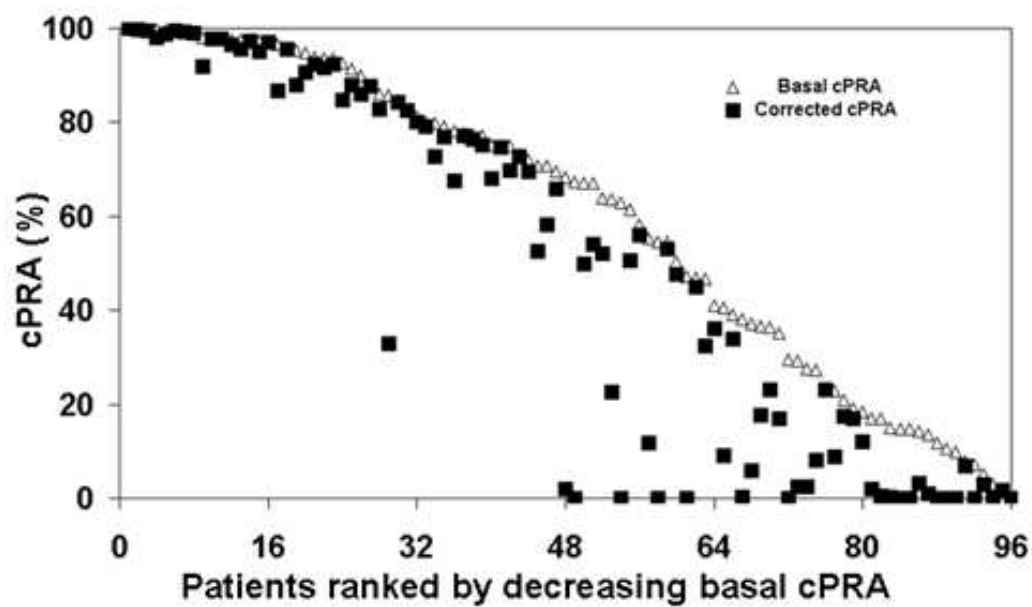


FIGURE 4

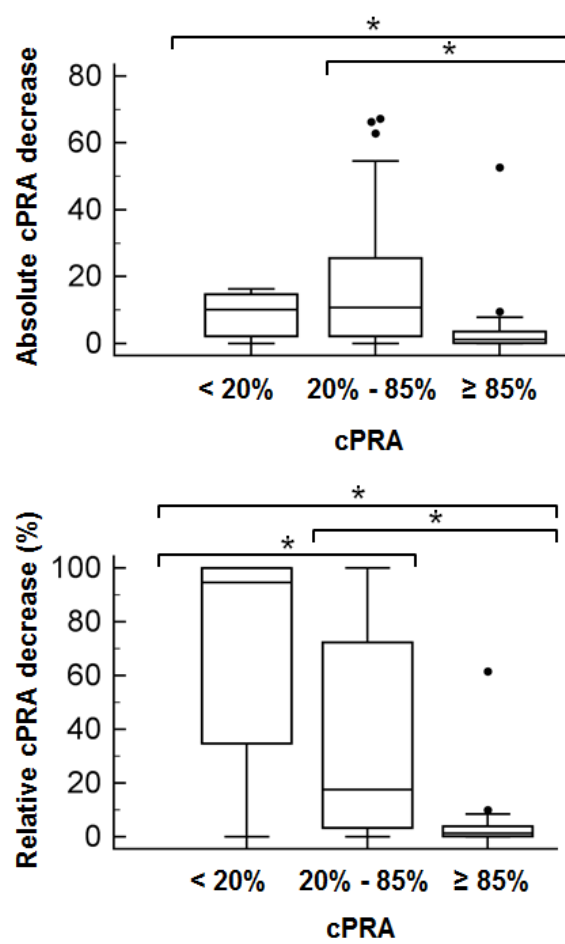
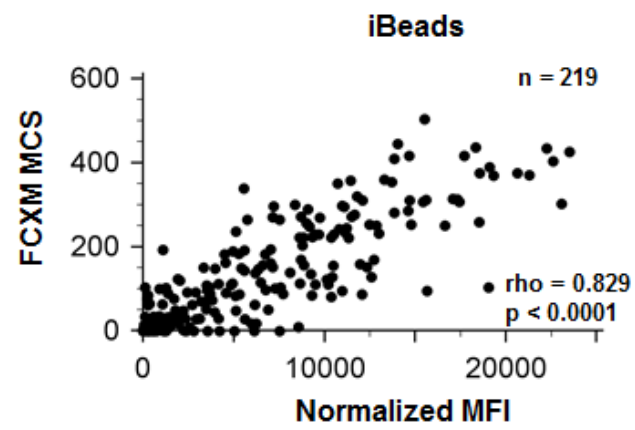
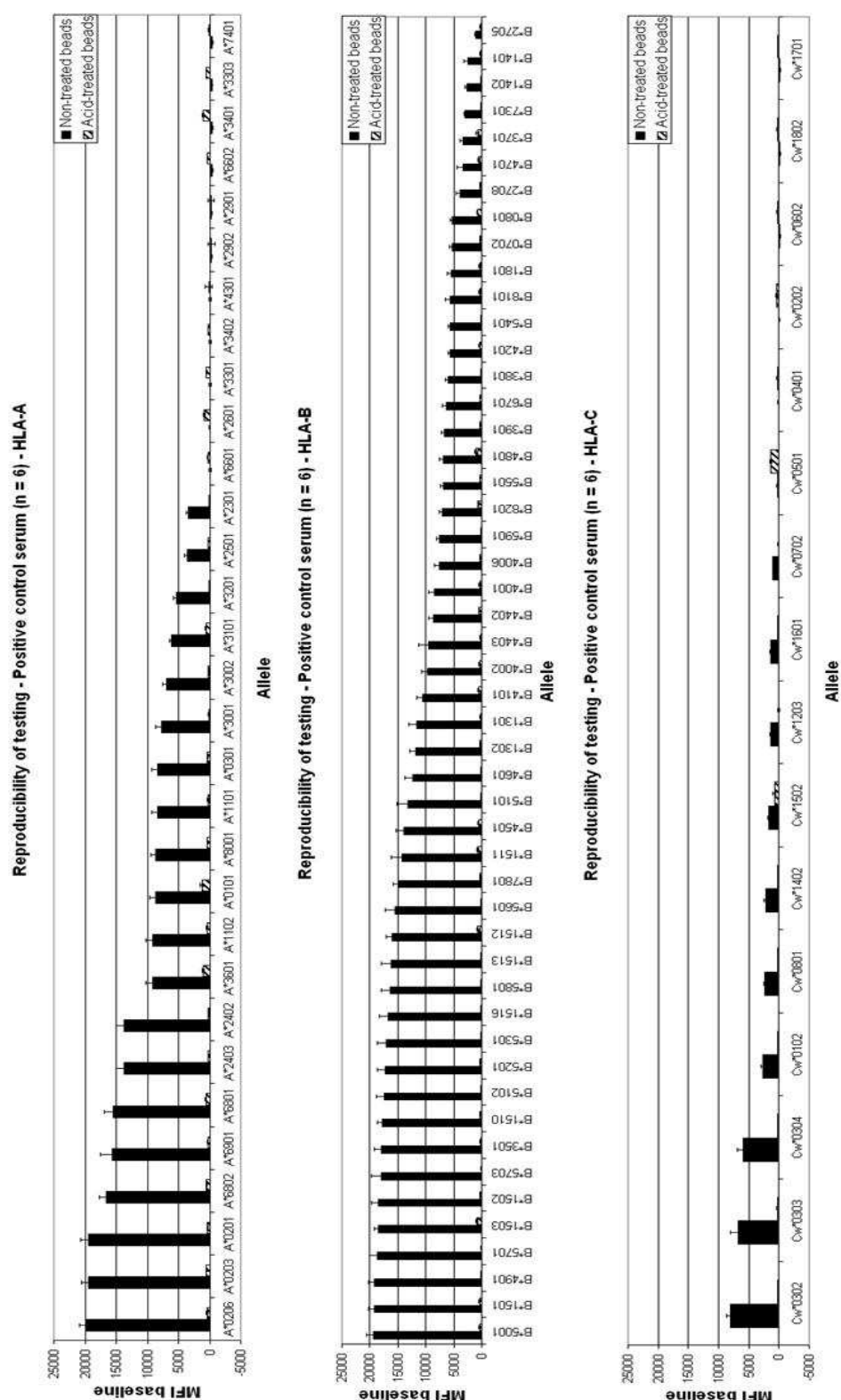


FIGURE 5



Supplemental digital content



SDC, Figure 1. Reproducibility of testing with a positive control serum (n=6) on non-treated (black bars) and acid-treated (hatched bars) beads for HLA-A (left panel), HLA-B (middle panel) and HLA-C (right panel).

SDC, Table 1. Distribution of the reactivity pattern in non-denaturing and denaturing conditions, for each of the SAFB HLA-A alleles, in positive serum samples.

Bead ID	Allele	Antigen	Number (and percentage) of positive serum samples for each D/N category			
			MFI≥1000 (non-treated beads)	D≥1.2N	1.2N>D>0.2N	D≤0.2 N
3	A*01:01	A 1	105	9 (9)	23 (22)	73 (70)
4	A*02:01	A 2	86	1 (1)	14 (16)	71 (83)
5	A*02:03	A 2	89	1 (1)	19 (21)	69 (78)
6	A*02:06	A 2	87	2 (2)	13 (15)	72 (83)
7	A*03:01	A 3	78	3 (4)	12 (15)	63 (81)
8	A*11:01	A11	84	5 (6)	5 (6)	74 (88)
9	A*11:02	A11	102	7 (7)	8 (8)	87 (85)
10	A*23:01	A23	131	6 (5)	22 (17)	103 (79)
11	A*24:02	A24	132	9 (7)	32 (24)	91 (69)
12	A*24:03	A24	132	7 (5)	32 (24)	93 (70)
13	A*25:01	A25	136	11 (8)	29 (21)	96 (71)
14	A*26:01	A26	99	17 (17)	30 (30)	52 (53)
15	A*29:01	A29	94	2 (2)	11 (12)	81 (86)
16	A*29:02	A29	90	2 (2)	12 (13)	76 (84)
17	A*30:01	A30	71	4 (6)	9 (13)	58 (82)
18	A*30:02	A30	69	4 (6)	18 (26)	47 (68)
19	A*31:01	A31	77	5 (6)	19 (25)	53 (69)
20	A*32:01	A32	118	3 (3)	8 (7)	107 (91)
21	A*33:01	A33	85	3 (4)	13 (15)	69 (81)
22	A*33:03	A33	91	1 (1)	17 (29)	73 (80)
23	A*34:01	A34	99	12 (12)	24 (24)	63 (64)
24	A*34:02	A34	102	4 (4)	13 (13)	85 (83)
25	A*36:01	A36	95	10 (11)	20 (22)	65 (68)
26	A*43:01	A43	95	10 (11)	22 (23)	63 (66)
27	A*66:01	A66	112	17 (15)	28 (25)	67 (60)
28	A*66:02	A66	114	10 (9)	30 (26)	74 (65)
29	A*68:01	A68	102	3 (3)	10 (10)	89 (87)
30	A*68:02	A68	121	4 (3)	14 (12)	103 (85)
31	A*69:01	A69	101	2 (2)	11 (11)	88 (87)
32	A*74:01	A74	81	3 (4)	14 (17)	64 (79)
33	A*80:01	A80	109	11 (10)	15 (14)	83 (76)

SDC, Table 2. Distribution of the reactivity pattern in non-denaturing and denaturing conditions, for each of the SAFB HLA-B alleles, in positive serum samples.

Bead ID	Allele	Antigen	Number (and percentage) of positive serum samples for each D/N category			
			MFI≥1000 (non-treated beads)	D≥1.2N	1.2N>D>0.2N	D≤0.2 N
34	B*07:02	B 7	106	5 (5)	13 (12)	88 (83)
35	B*08:01	B 8	114	18 (16)	24 (21)	72 (63)
97	B*13:01	B13	108	4 (4)	4 (4)	100 (93)
36	B*13:02	B13	116	3 (3)	4 (3)	109 (94)
37	B*14:01	B64	67	4 (6)	6 (9)	57 (85)
38	B*14:02	B65	72	4 (6)	5 (7)	63 (88)
39	B*15:01	B62	96	4 (4)	12 (13)	80 (83)
40	B*15:02	B75	109	6 (6)	14 (13)	89 (82)
41	B*15:03	B72	98	7 (7)	13 (13)	78 (80)
42	B*15:10	B71	99	3 (3)	10 (10)	86 (87)
98	B*15:11	B75	89	5 (6)	15 (17)	69 (78)
43	B*15:12	B76	172	7 (4)	20 (12)	145 (84)
44	B*15:13	B77	95	4 (4)	7 (7)	84 (88)
45	B*15:16	B63	127	6 (5)	14 (11)	107 (84)
46	B*18:01	B18	85	3 (4)	11 (13)	71 (84)
47	B*27:05	B27	115	3 (3)	11 (10)	101 (88)
48	B*27:08	B27	113	5 (4)	9 (8)	99 (88)
49	B*35:01	B35	101	2 (2)	4 (4)	95 (94)
50	B*37:01	B37	124	13 (10)	29 (23)	82 (66)
51	B*38:01	B38	98	2 (2)	7 (7)	89 (91)
52	B*39:01	B39	83	2 (2)	8 (10)	73 (88)
53	B*40:01	B60	107	10 (9)	13 (12)	84 (79)
54	B*40:02	B61	104	2 (2)	7 (7)	95 (91)
99	B*40:06	B61	96	3 (3)	6 (6)	87 (91)
55	B*41:01	B41	111	9 (8)	18 (16)	84 (76)
56	B*42:01	B42	112	6 (5)	12 (11)	94 (84)
57	B*44:02	B44	120	15 (13)	26 (22)	79 (66)
58	B*44:03	B44	110	6 (5)	8 (7)	96 (87)
59	B*45:01	B45	138	10 (7)	17 (12)	111 (80)
60	B*46:01	B46	93	3 (3)	11 (12)	79 (85)
61	B*47:01	B47	94	5 (5)	11 (12)	78 (83)
62	B*48:01	B48	97	9 (9)	9 (9)	79 (81)
63	B*49:01	B49	131	2 (2)	8 (6)	121 (92)
64	B*50:01	B50	115	6 (5)	16 (14)	93 (81)
65	B*51:01	B51	100	2 (2)	5 (5)	93 (93)
66	B*51:02	B51	120	1 (1)	6 (5)	113 (94)

SDC, Table 2 (continued)

Bead ID	Allele	Antigen	Number (and percentage) of positive serum samples for each D/N category			
			MFI \geq 1000 (non-treated beads)	D \geq 1.2N	1.2N>D>0.2N	D \leq 0.2 N
67	B*52:01	B52	111	3 (3)	7 (6)	101 (91)
68	B*53:01	B53	109	0 (0)	2 (2)	107 (98)
69	B*54:01	B54	105	3 (3)	7 (7)	95 (90)
70	B*55:01	B55	111	3 (3)	10 (9)	98 (88)
71	B*56:01	B56	112	4 (4)	2 (2)	106 (95)
72	B*57:01	B57	130	0 (0)	1 (1)	129 (99)
73	B*57:03	B57	127	1 (1)	1 (1)	125 (98)
74	B*58:01	B58	109	2 (2)	3 (3)	104 (95)
75	B*59:01	B59	108	3 (3)	5 (5)	100 (93)
76	B*67:01	B67	126	3 (2)	14 (11)	109 (87)
77	B*73:01	B73	106	2 (2)	13 (12)	91 (86)
78	B*78:01	B78	99	3 (3)	8 (8)	88 (89)
79	B*81:01	B81	102	5 (5)	7 (7)	90 (88)
80	B*82:01	B82	145	11 (8)	25 (17)	109 (75)

SDC, Table 3. Distribution of the reactivity pattern in non-denaturing and denaturing conditions, for each of the SAFB HLA-Cw alleles, in positive serum samples.

Bead ID	Allele	Antigen	Number (and percentage) of positive serum samples for each D/N category			
			MFI \geq 1000 (non-treated beads)	D \geq 1.2N	1.2N>D>0.2N	D \leq 0.2 N
81	C*01:02	Cw 1	63	8 (13)	13 (21)	42 (67)
82	C*02:02	Cw 2	80	10 (13)	15 (19)	55 (69)
83	C*03:02	Cw10	62	4 (6)	8 (13)	50 (81)
84	C*03:03	Cw 9	64	3 (5)	8 (13)	53 (83)
85	C*03:04	Cw10	56	1 (2)	5 (9)	50 (89)
86	C*04:01	Cw 4	43	4 (9)	9 (21)	30 (70)
87	C*05:01	Cw 5	73	9 (12)	20 (27)	44 (60)
88	C*06:02	Cw 6	69	11 (16)	12 (17)	46 (67)
89	C*07:02	Cw 7	54	5 (9)	24 (44)	25 (46)
90	C*08:01	Cw 8	49	3 (6)	4 (8)	42 (86)
91	C*12:03	Cw12	53	6 (12)	13 (25)	34 (65)
92	C*14:02	Cw14	47	6 (13)	2 (4)	39 (83)
93	C*15:02	Cw15	85	10 (12)	21 (25)	54 (64)
94	C*16:01	Cw16	44	7 (16)	5 (11)	32 (72)
95	C*17:01	Cw17	96	9 (9)	31 (32)	56 (58)
96	C*18:02	Cw18	64	5 (8)	8 (13)	51 (80)

SDC, Table 4. Sub-categorization of anti-dHLA “strength” as measured with the D/N ratio, according to the MFI “strength” in the non-treated condition.

MFI range (non-treated)	n	$1.2N \leq D \leq 1.4N$ (%)	$1.4N < D \leq 1.6N$ (%)	$1.6N < D$ (%)
≥ 8000	60	30 (50)	19 (32)	11 (18)
3000 - 7999	148	22 (15)	24 (16)	102 (69)
2000 - 2999	97	16 (16)	13 (13)	68 (70)
1000 - 1999	226	25 (11)	14 (6)	187 (83)

SDC, Table 5. Between lots comparison of positivity

Lot	Patients number	Anti-nHLA		Anti-dHLA		Beads number	Fisher's exact test
		Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)		
005	25	373 (80)	96 (20)	84 (73)	31 (27)	584	p=0.13
003	3	39 (59)	27 (41)	12 (75)	4 (25)	82	p=0.27
002	12	302 (69)	138 (31)	29 (66)	15 (34)	484	p=0.73

SDC, Table 6. Sub-categorization of FCXM-tested anti-dHLA and anti-nHLA, depending on their MFI strength.

		n	Median	Minimum	Maximum	1 st -3 rd quartiles	Mann- Whitney U test
2000 ≤ MFI < 3000	Anti-dHLA	14	2360	2088	2997	2182-2941	p = 0.96
	Anti-nHLA	12	2386	2098	2950	2179-2930	
3000 ≤ MFI < 8000	Anti-dHLA	29	4853	7631	7631	3231-7094	p = 0.62
	Anti-nHLA	49	4816	7995	7995	3227-7238	
8000 ≤ MFI ≤ 12779	Anti-dHLA	19	10610	12779	12779	8586-12684	p = 0.71
	Anti-nHLA	56	10481	12615	12615	8374-12212	

SDC, Table 7. Comparison of FCXM positivity between anti-nHLA and anti-dHLA, according to MFI sub-categorization.

	Anti-nHLA		Anti-dHLA		Chi-square test
	Positive XM (%)	Negative XM (%)	Positive XM (%)	Negative XM (%)	
2000 ≤ MFI < 3000	5 (42)	7 (58)	2 (14)	12 (86)	p = 0.26
3000 ≤ MFI < 8000	33 (67)	16 (33)	3 (10)	26 (90)	p < 0.0001
8000 ≤ MFI ≤ 12779	53 (95)	3 (5)	5 (26)	14 (74)	p < 0.0001

VI-2 – Deuxième article : Analyse épitopique de la réponse humorale dirigée contre les molécules HLA natives ou dénaturées en transplantation d'organe

Article publié dans la revue **European Journal of Immunology**
(<http://www.interscience.wiley.com/>)

« Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation »

Jonathan Visentin, Gwendaline Guidicelli, Jean-François Moreau, Jar-How Lee and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

La suite logique du travail précédent était d'analyser de manière plus précise les trois catégories d'anticorps anti-HLA que nous avons définies grâce à l'utilisation du traitement acide des billes SAG de classe I. En effet, il était particulièrement important de comprendre pourquoi notre seuil de définition des anti-dHLA était parfois inadéquat, et pourquoi certains anti-nHLA avaient un comportement intermédiaire. Etant donné l'incapacité d'adsorber/éluer la plupart des anti-dHLA, ceux-ci ne reconnaissant pas les molécules HLA exprimées par des cellules normales, nous avons choisi d'utiliser une approche d'épuisement des anticorps contenus dans le sérum du patient. Nous avons adsorbés les anti-HLA sériques à travers le contact avec un nombre suffisamment important de cellules au préalable testées pour l'expression de molécules HLA de classe I natives (W6/32) et dénaturées (HC-10). Les sérums avant et après épuisement étaient ensuite testés en SAG classe I avec des billes traitées ou non traitées à l'acide, dans la même série afin de minimiser les différences de résultats liées à la reproductibilité de la technique. La comparaison des profils permettait alors de définir si les anticorps reconnaissaient les molécules HLA natives, et dans certain cas les épitopes qui étaient reconnus.

Mon rôle dans cette étude a consisté en la réalisation des marquages cellulaires pour analyse en cytométrie en flux après éventuel isolement des lymphocytes du sang périphérique (PBL pour *peripheral blood lymphocytes*) en Ficoll, la réalisation des expériences d'épuisement, des tests en SAG classe I, l'analyse statistique des résultats et l'identification des épitopes reconnus, puis la rédaction de l'article.

Les marquages W6/32 et HC-10 des PBL et des lignées lymphocytaires T utilisées pour les épuisements montraient une faible expression de FHC en comparaison à l'expression des molécules HLA natives (Figure 1). Au total, 84 réactivités ont pu être étudiées sur ces cellules dont 28 anti-dHLA, 23 anti-nHLA intermédiaires et 33 anti-nHLA « prototypiques ». Un épuisement était considéré comme significatif lorsque la MFI résiduelle était inférieure à 70% de la MFI initiale (voir la partie « *Material and methods* »). La plupart des anti-dHLA (24/28) conservaient leurs MFI sur billes traitées ou non-traitées, confirmant le fait que la plupart de ces anticorps n'étaient pas capable d'interagir avec des cellules (Figure 2, panels C). Les 4 restants ne montraient qu'une faible diminution de leur réactivité contre les billes non traitées. Les anti-nHLA intermédiaires montraient des comportements variés : certains conservaient leur MFI sur les deux types de billes (3/23), d'autres ne voyaient chuter leur MFI

que sur les billes non traitées (9/23) et les restants montraient une diminution équivalente de leur MFI sur les deux types de billes (11/23) (Figure 2, panel B). En comparaison, 32/33 d'anti-nHLA « prototypiques » montraient un épuisement significatif de leur MFI sur les billes non traitées. Ces résultats suggéraient que le sérum des patients pouvait contenir des mélanges d'anti-nHLA et d'anti-dHLA reconnaissant les mêmes antigènes, situation illustrée avec le cas n°1 (Table 3), et également des anti-nHLA reconnaissant des épitopes conservés après traitement acide des billes, situation illustrée avec le cas n°2 (Table 4). Enfin, nous avons décrit avec le cas n°3 (Table 5) un nouvel épitope cryptique reconnaissable par des anti-dHLA.

Title: Complexity of the anti-HLA antibody allogeneic response involving native and denatured epitopes

Authors:

Jonathan VISENTIN,^{1,2} Gwendaline GUIDICELLI,¹ Jean-François MOREAU,^{1,2} Jar-How LEE,³ and Jean-Luc TAUPIN,^{1,2}

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

²UMR 5164 CNRS, Université de Bordeaux, Talence, France

³One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA

Keywords: HLA antibodies, anti-denatured HLA antibodies, HLA epitopes, Luminex Single Antigen Bead Assay

Corresponding author:

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel +33 5-57-82-08-84 / Fax +33 5-56-79-60-79

Email: jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Abbreviations: Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibody(ies), Anti-nHLA: anti-native HLA antibody(ies), dHLA: denatured HLA, FCXM: flow cytometry crossmatch, FHC: free heavy chains, LSAB: Luminex Single Antigen Beads, MCS: mean channel shift, MFI: mean fluorescence intensity, nHLA: native HLA.

Abstract

Anti-HLA donor-specific antibodies (DSA) are deleterious for organ transplant survival. Class I HLA DSA are identified by using the Luminex Single Antigen Beads (LSAB) assay, which also detects anti-denatured HLA antibodies (anti-dHLA). Anti-dHLA are thought to be unable to recognize native HLA (nHLA) on the cell surface and therefore to be clinically irrelevant. Acid denaturation of nHLA on LSAB allows anti-dHLA to be discriminated from anti-nHLA. We previously defined a threshold for the ratio between mean fluorescence intensity against acid-treated (D for denaturation) and non-treated (N) LSAB, $D \geq 1.2N$ identifying the anti-dHLA. However, some anti-dHLA remained able to bind nHLA on lymphocytes in flow cytometry crossmatches, and some anti-nHLA conserved significant reactivity towards acid-treated LSAB. After depleting serum anti-nHLA reactivity with HLA-typed cells, we analyzed the residual LSAB reactivity towards non-treated and acid-treated LSAB, and then evaluated the ability of antibodies to recognize nHLA alleles individually. We observed that sera can contain mixtures of anti-nHLA and anti-dHLA, or anti-nHLA recognizing acid-resistant epitopes, all possibly targeting the same allele(s). Therefore, the anti-HLA antibody response can be highly complex and subtle, as is the accurate identification of pathogenic anti-HLA antibodies in human serum.

Introduction

Typically produced following exposure to foreign HLA during pregnancy, after transfusion or upon organ transplantation, allogeneic anti-HLA antibodies are deleterious for the function and survival of transplanted organs when they are donor-specific (the so-called anti-HLA donor-specific antibodies or DSA) [1-6]. Understanding of the alloantibody response at antigen and epitope levels has been hampered since the origins of histocompatibility testing owing to the lack of sensitivity and resolution of the available tools. A major step forward was the release of the Luminex Single Antigen Beads (LSAB) assays, which made possible the simultaneous analysis of nearly a hundred different class I or class II HLA alleles with a highly sensitive flow cytometric read-out [7, 8]. Using this tool with monoclonal anti-HLA antibodies or alloantibodies eluted after binding on cell lines expressing a single recombinant HLA allele, Terasaki's group indexed about two hundred distinct HLA epitopes accessible for antibody recognition [9]. The same task was achieved by Duquesnoy's group using a theoretical algorithm that predicts HLA epitopes on the molecular surface and relies on stereochemical modeling of the epitope–paratope interfaces of antigen–antibody complexes [10]. Of note, these two distinct methods identified consensual epitopes in most cases [11].

The LSAB assays recently raised new issues as they frequently detect a so-called “natural” HLA sensitization among individuals who have never encountered allogeneic HLA [12]. Indeed, in addition to native class I HLA (nHLA), LSAB also display denatured class I HLA (dHLA) on their surface in the form of free HLA heavy chain (FHC) dissociated from beta 2-microglobulin and peptide [12]. In routine practice, anti-denatured HLA antibodies (anti-dHLA) are not distinguishable from anti-native HLA antibodies (anti-nHLA). Exposure of LSAB to low pH, which dissociates the class I HLA heterotrimer and leaves the beads covered with dHLA only, was used by El-Awar et al. to identify dHLA epitopes recognized by natural antibodies. Most of them were cryptic epitopes involving hidden residues, i.e. not

surface-exposed and therefore not accessible to antibody on nHLA, but some were only partially cryptic or were even surface-exposed [13].

We recently demonstrated with a large cohort of HLA-sensitized recipients awaiting kidneys that anti-dHLA antibodies defined by LSAB acid treatment are also highly prevalent in these patients and cover a wide array of alleles/antigens [14]. We established a threshold for the ratio between mean fluorescence intensity (MFI) with acid-treated (D condition) and non-treated (N condition) LSAB, in order to differentiate anti-dHLA ($D \geq 1.2N$) from anti-nHLA ($D < 1.2N$) [14]. We validated this threshold by using the T-lymphocyte flow cytometry crossmatch (FCXM) assay, as resting T-lymphocytes are known to express negligible levels of FHC [15-17]. Indeed, in our hands, anti-dHLA provided negative FCXM in most cases, as opposed to anti-nHLA with comparable LSAB MFI strength. Nevertheless, some anti-dHLA were still able to provide positive FCXM. Since most of the recipients had documented allogeneic sensitization events, we hypothesized that the observed inconsistencies might be due to mixed anti-nHLA and anti-dHLA reactivities targeting the same allele(s) in a given serum. Such a scenario might also explain why some anti-nHLA displayed a significant reactivity toward acid-treated LSAB ($0.2N < D < 1.2N$), the latter antibodies being subcategorized into a third category, the intermediate anti-nHLA.

Since the existence of such antibody associations has not been demonstrated so far, we investigated the complexity of the anti-HLA antibody response towards nHLA and dHLA molecules by using sera depletion with HLA-typed cells. Then, we compared the LSAB reactivity profile of the whole and depleted sera on non-treated and acid-treated LSAB. We report here the different situations we encountered and illustrate them with selected cases that we studied at the epitope level.

Results

Relative expression of native and denatured class I HLA on target cells

Before depleting sera with PBMC and T-lymphocyte cell lines, we evaluated the relative amounts of native and denatured class I HLA molecules present on their surface using flow cytometry. In order to be able to distinguish anti-nHLA from anti-dHLA, we checked that PBMC and T-lymphocyte cell lines expressed as few FHC molecules as possible. We stained cells with the anti-class I mAbs W6/32 and HC-10, which recognize respectively a conformation-dependent epitope common to all native class I HLA and an epitope restricted to the majority of class I HLA FHC [18, 19]. We reproducibly observed a weak signal with HC-10 mAb for all the cells we tested (Figure 1, panel A), but we considered it as negligible when compared to the 15 fold stronger staining observed for W6/32 (median MFI 48225, 1st-3rd quartiles 35797-61150 with W6/32 versus median MFI 850, 1st-3rd quartiles 334-2180 with HC-10) (Figure 1, panel B).

Characteristics of tested sera

A total of 35 different sera from as many patients were examined and 21 different cells with known class I HLA phenotype were used as a depletion substrate, allowing 33 different HLA alleles (13 HLA-A, 15 HLA-B and 5 HLA-C) to be tested. As one serum could react against more than one HLA displayed by any given cell, a total of 84 antibody specificities were analyzed. Among them, 33 were prototypical anti-nHLA ($D \leq 0.2N$), 23 were intermediate anti-nHLA ($0.2N < D < 1.2N$) and 28 were anti-dHLA ($D \geq 1.2N$). Characteristics of LSAB reactivities for all three categories are shown in Table 1.

Depletion of reactivity towards non-treated and acid-treated LSAB

As expected, sera reactivity towards non-treated LSAB was more efficiently depleted for prototypical anti-nHLA (median residual MFI of 11%, 1st-3rd quartiles 3-27%) than for

intermediate anti-nHLA (median residual MFI of 23%, 1st-3rd quartiles 17-46%), and only very slightly diminished for anti-dHLA (median residual MFI of 85%, 1st-3rd quartiles 74-98%) (Figure 2 panels A, B and C, respectively, and comparison with Kruskal-Wallis test in panel D, $p < 0.05$).

Sera depletion against acid-treated LSAB could be analyzed for sera containing intermediate anti-nHLA or anti-dHLA, but not for those containing prototypic anti-nHLA, as they did not display any significant reactivity towards acid-treated LSAB. None of the 28 anti-dHLA tested displayed any significant MFI decrease after depletion (Table II) (median residual MFI of 91%, 1st-3rd quartiles 82-96%), whereas 13/23 (57%) intermediate anti-nHLA did (median residual MFI of 69%, 1st-3rd quartiles 26-87%) (Mann-Whitney U test, $p = 0.0005$).

Comparison of residual reactivity towards non-treated and acid-treated LSAB

Anti-dHLA and intermediate anti-nHLA displayed distinct behaviors in cell depletion experiments (Figure 3). Twenty-four of the 28 anti-dHLA (86%) (Figure 3, panel A) showed a high and comparable residual reactivity towards both non-treated and acid-treated LSAB, suggesting that these antibody reactivities had no propensity to bind to the cells. For the remaining 4 anti-dHLA (14%), the depletion efficiency measured with non-treated LSAB was low but significant (3 different alleles found in 4 different sera depleted with 3 different cells). In contrast, the intermediate anti-nHLA (Figure 3 panel B) displayed more complex features and three main patterns emerged. The first, which concerned a few cases, was close if not identical to that reported above for the majority of anti-dHLA, i.e. the absence of depletion following incubation with the cells [3/23 (13%) intermediate anti-nHLA from 3 different sera targeting 3 different alleles and depleted with 3 different cells]. The second was a profound MFI decrease observed only towards non-treated LSAB [9/23 (39%) intermediate anti-nHLA from 8 different sera targeting 8 different alleles and depleted with 6 different cells],

suggesting that an anti-nHLA reactivity had been depleted upon incubation with the cells, without altering the capacity of the serum to recognize the same antigen in a denatured form. The third was a strong MFI decrease with both kinds of beads [11/23 (48%) intermediate anti-nHLA from 6 different sera targeting 7 different alleles and depleted with 5 different cells], suggesting that cell depletion removed an antibody reactivity that recognized both the native and denatured forms of the antigen.

Epitope analysis of emerging reactivity patterns

Using three representative cases (Tables 3 to 5) which we studied at the epitopic level, we described the different antibody reactivity patterns we encountered for the sera following the nHLA depletion experiments. They were illustrated by localizing the targeted amino acid residues on three-dimensional molecular models (Figure 4).

Case #1 (Table 3) displayed a mixture of antibodies directed against nHLA and dHLA epitopes. For this serum, 1 HLA-A and 29 HLA-B alleles were positive with non-treated LSAB. Among the 8 HLA-B alleles classified as targeted by anti-dHLA, 4 were tested with FCXM on T cells from 4 donors expressing HLA-B7, B42, B55 or B67 as the unique serum antibody mismatch target. All were found positive, albeit weakly [mean channel shift (MCS) = 77, 74, 51 and 52, respectively]. When the Jurkat T-lymphocyte cell line (HLA-A3; B7,35) was used for serum antibody depletion, thus allowing the reactivity against these three antigens to be analyzed, MFI towards non-treated LSAB decreased for all 30 alleles. This result could be explained by the presence of one anti-nHLA antibody directed against epitope #216 (76E+80N/76E+82R/76E+83G) described by El-Awar et al. [9], which corresponds to the 76ERN eplet reported by Duquesnoy et al. [11] and is widely known as the Bw6 class I public epitope (Figure 4A). Depletion of 76ERN reactivity was reproduced with two other cells also expressing 76ERN (results not shown). For HLA-A3, which does not contain 76ERN, the anti-nHLA might be directed against epitope #6 according to El-Awar et al. [9]

and corresponding to eplet 161D for Duquesnoy et al. [11] (Figure 4B). Of note, despite being classified as targeted by an anti-dHLA, the 8 HLA-B alleles all carried the Bw6 epitope but still remained positive on acid-treated LSAB after depletion. Interestingly, these 8 alleles share the cryptic epitope #5024 (66I+70Q) described by El-Awar et al. [13] (Figure 4C), which is not displayed by the 21 other alleles expressing 76ERN that are present in the LSAB panel. The absence of depletion of (66I+70Q) reactivity was reproduced with another cell homozygous for the HLA-B7 antigen (result not shown). Therefore, Case #1 contained a mixture of anti-nHLA and anti-dHLA reactivities: an anti-nHLA recognizing HLA-A3, an anti-nHLA binding the Bw6 epitope, and an anti-dHLA targeting an epitope displayed by the denatured forms of some Bw6 carrying alleles.

Case #2 (Table 4) displayed reactivity against an acid-resistant epitope only. Ten HLA-A alleles were positive with non-treated LSAB, 8 of them being classified as targeted by intermediate anti-nHLA and 2 by anti-dHLA. Three of them were tested with FCXM on T cells from donors expressing HLA-A3, A30 or A32 as the unique serum antibody mismatched target and were found positive (MCS = 147, 95 and 69, respectively). When the T-lymphocyte cell line CEM (HLA-A1,31; B8,60) was used for serum antibody depletion of anti-nHLA specificities, thus allowing the reactivity against HLA-A1 and 31 to be analyzed, MFI decreased for all the 10 positive alleles with non-treated LSAB and acid-treated LSAB. This suggested that this serum displayed an antibody targeting an epitope present on both the native and denatured HLA forms of these alleles, likely the 62QE eplet according to Duquesnoy et al. [11], which corresponds to the partially cryptic epitope #5053 (62Q) for El-Awar et al. [13] (Figure 4D).

Case #3 (Table 5) was a serum displaying reactivity towards a cryptic epitope. It reacted against 21 HLA-B alleles on non-treated LSAB, all being classified as targeted by anti-dHLA. Among them, 13 were tested with FCXM on T cells from donors expressing HLA-B13, B18, B37, B44*02, B44*03, B49, B50, B60, B61, B62, B72, B75 or B77 as the unique serum

antibody mismatch target and were found negative ($MCS \leq 2$ for all). When HLA-A1,2; B37,57 PBMCs were used for serum antibody depletion the MFI did not decrease either towards non-treated or acid-treated LSAB. Identical results were obtained with three additional cells expressing B18, B*44:03 or B60 (results not shown). The 21 HLA-B alleles did not share any already described cryptic epitope, but amino acid sequence alignment showed that they were the only ones to display a serine (S) residue at position 67, which is not surface-exposed in the native HLA molecule. Indeed, this residue of the peptide binding groove, which is located on the $\alpha 1$ -helix and oriented inward, is masked by the peptide bound to the cleft (Figure 4E). We therefore concluded that the anti-dHLA present in this serum recognized the hidden 67S residue, the name of this as yet unreferenced epitope being (67S).

Discussion

The aims of this study were to explore the complexity of the class I anti-HLA antibody response towards nHLA and dHLA molecules and to confirm our hypothesis that patients' sera could contain complex mixtures of anti-nHLA and anti-dHLA reactivities targeting the same allele(s). Of note, this study only applies to the denatured HLA molecules displayed by non-treated LSAB whose unfolding can also be obtained by acid treatment. They may indeed represent only a part of all the possible but as yet unknown types of non-native HLA molecules that may exist on the cell surface or on non-treated LSAB.

We performed depletion experiments with HLA-typed PBMC and T-lymphocyte cell lines expressing high levels of native HLA molecules and very low levels of FHC, as preliminary experiments showed that these cells were very efficient at capturing high amounts of anti-HLA antibodies (results not shown). The levels of FHC expression as tested by HC-10 staining appeared slightly different among the cells used for the depletion assays, which could suggest that cells with a higher expression of FHC are more efficient for depleting anti-dHLA. However, we ruled out this hypothesis for the following two reasons: first, 6 of the 8 cells that were able to deplete the reactivity towards the dHLA of sera containing anti-dHLA or intermediate anti-nHLA were also used to test other anti-dHLA antibodies but did not show any depletion; second, there was no correlation between the depletion efficiency of reactivity towards denatured HLA and the cellular level of FHC (results not shown).

As expected, most of the prototypical anti-nHLA could be depleted with a high efficiency as proven by the abrogation of the depleted serum reactivity towards non-treated LSAB. This suggested the presence of the sole anti-nHLA reactivity not associated with a distinct anti-dHLA antibody recognizing the same allele. Such a situation was exemplified with HLA-A*03:01 from Case #1. Furthermore, most of the anti-dHLA displayed no decrease in their reactivity towards non-treated and acid-treated LSAB following cellular depletion, as would be obtained in the presence of a pure anti-dHLA reactivity not associated with a distinct anti-

nHLA recognizing the same allele. Such a situation was typically depicted with epitope (67S) in Case #3. Interestingly, Case #1 also illustrated the possible association of several antibodies recognizing epitopes on different HLA alleles, either in their native or denatured forms.

Some anti-dHLA displayed weak but significant cellular depletion of their reactivity when tested towards non-treated LSAB. This was illustrated with Case #1, showing the possible coexistence of two different antibodies recognizing two distinct epitopes [(66I+70Q)/#5024 and Bw6] on native and denatured forms of the same HLA alleles. This may explain how an allele primarily classified as recognized by an anti-dHLA could provide a positive FCXM. Indeed, in this case and on the sole basis of the D/N ratio, the weaker reactivity towards the allele's native form than towards the denatured one would lead to erroneously consider this serum as targeting the denatured antigen only, even if the anti-native antibody has sufficient strength to be detected with FCXM.

Intermediate anti-nHLA displayed diversified patterns. A few of them behaved like the majority of anti-dHLA, suggesting that some anti-dHLA could have been misclassified in our seminal work [14]. The second pattern showed a dissociated behavior between non-treated and acid-treated LSAB, as expected in the presence of a mix of antibodies recognizing different epitopes located on the same allele, some of them being restricted to nHLA and the others to dHLA. Finally, some intermediate anti-nHLA displayed a strong MFI decrease towards non-treated and acid-treated LSAB, as would be obtained in the presence of an antibody recognizing an epitope on the HLA native form which is conserved after acid denaturation. Such a situation occurred with Case #2, even if two of the ten alleles harboring the recognized epitope (62Q)/#5053 were classified as anti-dHLA. Of note, several epitopes accessible on nHLA have been described at this amino acid position (62G, 62E, 62L and others) [11], whereas El-Awar et al. [13] reported residue 62Q as being partially cryptic, and the 62R residue recognized by mAb HC-10 is known to be accessible on denatured HLA only

[18]. These data indicate that the surface accessibility of residue 62 on native HLA is particular, as it depends on the amino acid occupying this position and could also be affected by the presence of the peptide bound to the cleft. We suggest that the significant MFI increase we observed on acid-treated LSAB for HLA-A*11:01 and A*32:01 could be due to a different peptide repertoire from that of other 62Q alleles. This might modulate the accessibility of 62Q, as it was previously shown [20].

The literature to date suggests that anti-dHLA are irrelevant since they are unable to recognize the donor HLA target on the cell surface and therefore have no influence on graft function or survival [14, 21-25]. Consequently, in graft allocation programs, it seems unreasonable to consider the HLA antigens targeted by such antibodies as unacceptable mismatches. Indeed, the access of such patients to transplants would be unnecessarily reduced and the waiting time to transplantation would be increased, with all the negative consequences in terms of patients' health and survival [26]. Therefore, correctly detecting these antibodies should allow the assessment of any patient's transplant access to be refined.

Transplanting over an immunological risk by overriding a positive crossmatch caused by preformed DSA is often required in highly sensitized recipients. An accurate assessment of DSA strength and nature would allow the risk taken to be correctly estimated. However, in the presence of a mixed reactivity against both nHLA and dHLA, the permissible antigens cannot be defined with the current virtual crossmatch strategy, which relies only on the LSAB assay performed in its classical mode. Hence, the acid treatment assay could play a role in identifying anti-dHLA in patients' sera and refining lists of unacceptable and permitted antigens.

This report sheds new light on the interpretation of the LSAB assay, underlining the importance of analyzing the whole antibody profile obtained with the non-treated beads, and not each antigen separately, in order to avoid the misclassification of an allele targeted by an anti-nHLA as the target of an anti-dHLA. Of note, the use of a final prospective cellular

crossmatch remains of paramount importance, as it will be able to estimate anti-nHLA strength more precisely [27]. Furthermore, anti-dHLA are not identified in current routine practice owing to time and cost constraints, as this strategy would require running two LSAB assays for any given serum. Nevertheless, this assay could be selectively used in particular situations, i.e. in the absence of a previous sensitizing event and when the patient's antibody profile does not correlate with the HLA typing of known allogeneic sensitizing events.

In conclusion, by deciphering with an experimental cellular approach the findings obtained with acid-treated LSAB, this study illustrates the great complexity of antibody-defined HLA epitopes, as testified by the high degree of polymorphism of the exposed surface or hidden amino acid positions on HLA molecules. It also demonstrates that subtle associations of anti-HLA antibodies can be found in a serum, and provides insights into class I anti-HLA antibody response for both academic and medical purposes.

Material and methods

PBMC and T-lymphocyte cell lines

PBMCs from donors were obtained by Ficoll Hypaque density gradient (Eurobio, Courtaboeuf, France). T-lymphocyte cell lines Jurkat and CEM (ATCC, Manassas, VA) were cultured in RPMI medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 8% fetal calf serum (PAA Laboratory, Pasching, Australia) and 2 mM L-Glutamine (Gibco). Low and high resolution (when required) HLA-A, -B, -C typing of donors and T-cell lines were performed with DNA techniques (respectively Olerup SSP, Stockholm, Sweden, and High Resolution Labtype SSO, One Lambda Inc, Canoga Park, CA).

Flow cytometric analysis

W6/32 mAb was purchased from ThermoFisher Scientific (Rockford, IL) and HC-10 Mab was kindly provided by One Lambda. About 150,000 cells were incubated for 30 min on ice with mAb at 10 µg/ml, then were washed twice and incubated with 200-fold diluted PE-labeled Goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG (H+L) (Beckman Coulter, Marseille, France) and were analyzed on a FACSCanto cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). PE fluorescence was analyzed on at least 5000 events gated on the forward and side scattered light morphological parameters for living lymphocytes. FCXM was performed on fresh lymph node or spleen mononuclear cells from deceased organ donors tested for compatibility with our waiting list patients, with the routine four-color staining protocol previously described [3]. The positivity threshold for T-lymphocytes was at an MCS value of 50 above the negative control, which is a serum pool from AB group non-allosensitized donors.

LSAB assay with acid-treated and non-treated beads

Sera from 35 class I HLA-sensitized patients from the cohort of our previous work were selected depending on HLA typing of cells available for the depletion experiments [14]. The LSAB assay was LabScreen LS1A04 (One Lambda), exploring 97 class I HLA antigens (31 HLA-A, 50 HLA-B and 16 HLA-Cw alleles). The N and D condition assays, and the classification of LSAB into three categories according to the MFI ratio between D and N conditions, were performed as previously described [14].

Serum depletion experiments

Serum depletion experiments were performed using freshly isolated PBMC or T-lymphocyte cell lines (organ donors and normal blood donors) chosen for expressing at least one HLA-A, -B or -Cw antigen against which the sera contained antibodies. PBS-diluted or neat serum (60 μ l) was incubated twice with $5 \cdot 10^6$ cells, each round for 30 min at room temperature. After centrifugation, the depleted serum was harvested and tested in parallel with the non-depleted serum on both non-treated and acid-treated LSAB. MFI values were normalized by subtraction of negative control bead. The efficiency of the depletion was expressed as the residual MFI percentage calculated from the MFI obtained on LSAB after depletion divided by the MFI measured before depletion. Serum antibody reactivity was considered as captured by cells when its residual LSAB MFI after cell depletion was below 70% of that for the non-depleted serum. The 70% value corresponded to the 10th percentile of the residual LSAB MFI observed against HLA variants not expressed by target cells and not sharing the native epitopes recognized by the captured antibody [9, 10]. It was obtained from the analysis of the 341 LSAB with this pattern from the 35 sera (median=92%, 10th-90th percentiles=70-115%).

Sequence alignment and structural analysis tools

Amino acid sequence alignments were performed with the IMGT sequence alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>). Residue localization and antibody accessibility were evaluated with the “space fill” command of the Cn3D structure software program [28] using HLA-A*02:01 as a model (MMDB ID: 82223, PDB ID: 3MGT) [29] downloaded from Entrez Molecular Modeling Database on the National Center for Biotechnology Information website: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).

Statistical analysis

Analysis was performed using conventional statistical methods. Descriptive statistics used median, 1st-3rd quartile and range. Independent quantitative variables were studied with the two-tailed Mann–Whitney U test or the Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison of subgroups according to Conover. Analyses were performed with MedCalc® software (Mariakerke, Belgium).

Acknowledgements

We are grateful to the technicians in the immunology laboratory for their technical expertise.

Conflict of interest disclosure

J.L. is an employee of One Lambda Inc.

No specific funding was obtained for this study.

The other authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

References

- 1 Dunn, T. B., Noreen, H., Gillingham, K., Maurer, D., Ozturk, O. G., Pruett, T. L., Bray, R. A., Gebel, H. M. and Matas, A. J., Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011. 11: 2132-2143.
- 2 Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G. S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D. and Suberbielle-Boissel, C., Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010. 21: 1398-1406.
- 3 Couzi, L., Araujo, C., Guidicelli, G., Bachelet, T., Moreau, K., Morel, D., Robert, G., Wallerand, H., Moreau, J. F., Taupin, J. L. and Merville, P., Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011. 91: 527-535.
- 4 Wiebe, C., Gibson, I. W., Blydt-Hansen, T. D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L. J., Goldberg, A., Birk, P. E., Rush, D. N. and Nickerson, P. W., Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012. 12: 1157-1167.
- 5 Hidalgo, L. G., Campbell, P. M., Sis, B., Einecke, G., Mengel, M., Chang, J., Sellares, J., Reeve, J. and Halloran, P. F., De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant* 2009. 9: 2532-2541.
- 6 Lachmann, N., Terasaki, P. I., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., Pratschke, J., Rudolph, B., Schmidt, D., Salama, A. and Schonemann, C., Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009. 87: 1505-1513.

- 7 Pei, R., Lee, J., Chen, T., Rojo, S. and Terasaki, P. I., Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 1999. 60: 1293-1302.
- 8 Pei, R., Lee, J. H., Shih, N. J., Chen, M. and Terasaki, P. I., Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003. 75: 43-49.
- 9 El-Awar, N., Terasaki, P. I., Cai, J., Deng, C. T., Ozawa, M. and Nguyen, A., Epitopes of the HLA-A, B, C, DR, DQ and MICA antigens. *Clin Transpl* 2007: 175-194.
- 10 Duquesnoy, R. J., A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. *Hum Immunol* 2006. 67: 847-862.
- 11 Duquesnoy, R. J. and Marrari, M., Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens. *Tissue Antigens* 2009. 74: 117-133.
- 12 Morales-Buenrostro, L. E., Terasaki, P. I., Marino-Vazquez, L. A., Lee, J. H., El-Awar, N. and Alberu, J., "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008. 86: 1111-1115.
- 13 El-Awar, N., Terasaki, P. I., Nguyen, A., Sasaki, N., Morales-Buenrostro, L. E., Saji, H., Maruya, E. and Poli, F., Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009. 70: 844-853.
- 14 Visentin, J., Guidicelli, G., Bachelet, T., Jacquelinet, C., Audry, B., Nong, T., Dubois, V., Moreau, J. F., Lee, J. H., Couzi, L., Merville, P. and Taupin, J. L., Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation. *Transplantation* 2014. 98: 738-744.
- 15 Schnabl, E., Stockinger, H., Majdic, O., Gaugitsch, H., Lindley, I. J., Maurer, D., Hajek-Rosenmayr, A. and Knapp, W., Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. *J Exp Med* 1990. 171: 1431-1442.

- 16 Pickl, W. F., Holter, W., Stockl, J., Majdic, O. and Knapp, W., Expression of beta 2-microglobulin-free HLA class I alpha-chains on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. *Immunology* 1996. 88: 104-109.
- 17 Bodnar, A., Bacso, Z., Jenei, A., Jovin, T. M., Edidin, M., Damjanovich, S. and Matko, J., Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 2003. 15: 331-339.
- 18 Perosa, F., Luccarelli, G., Prete, M., Favoino, E., Ferrone, S. and Dammacco, F., Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. *J Immunol* 2003. 171: 1918-1926.
- 19 Ladasky, J. J., Shum, B. P., Canavez, F., Seuanez, H. N. and Parham, P., Residue 3 of beta2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody. *Immunogenetics* 1999. 49: 312-320.
- 20 Mulder, A., Eijssink, C., Kester, M. G., Franke, M. E., Kardol, M. J., Heemskerk, M. H., van Kooten, C., Verreck, F. A., Drijfhout, J. W., Koning, F., Doxiadis, II and Claas, F. H., Impact of peptides on the recognition of HLA class I molecules by human HLA antibodies. *J Immunol* 2005. 175: 5950-5957.
- 21 Cai, J., Terasaki, P. I., Anderson, N., Lachmann, N. and Schonemann, C., Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009. 88: 226-230.
- 22 Otten, H. G., Verhaar, M. C., Borst, H. P., van Eck, M., van Ginkel, W. G., Hene, R. J. and van Zuilen, A. D., The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2013. 173: 536-543.
- 23 Jacob, E. K., De Goey, S. R. and Gandhi, M. J., Positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch results in two cases. *Transpl Immunol* 2011. 25: 77-81.

- 24 Nikaein, A., El-Awar, N., Hunt, J., Rosenthal, E. J., Eichhorn, E., Hall, S., Boehrer, J., Magee, M., Pieniek, M., Brinkman, W. and Dewey, T., Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* 2012. 31: 443-447.
- 25 Pereira, S., Perkins, S., Lee, J. H., Shumway, W., LeFor, W., Lopez-Cepero, M., Wong, C., Connolly, A., Tan, J. C. and Grumet, F. C., Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol* 2011. 72: 492-498.
- 26 Montgomery, R. A., Lonze, B. E., King, K. E., Kraus, E. S., Kucirka, L. M., Locke, J. E., Warren, D. S., Simpkins, C. E., Dagher, N. N., Singer, A. L., Zachary, A. A. and Segev, D. L., Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med* 2011. 365: 318-326.
- 27 Tait, B. D., Susal, C., Gebel, H. M., Nickerson, P. W., Zachary, A. A., Claas, F. H., Reed, E. F., Bray, R. A., Campbell, P., Chapman, J. R., Coates, P. T., Colvin, R. B., Cozzi, E., Doxiadis, II, Fuggle, S. V., Gill, J., Glotz, D., Lachmann, N., Mohanakumar, T., Suciu-Foca, N., Sumitran-Holgersson, S., Tanabe, K., Taylor, C. J., Tyan, D. B., Webster, A., Zeevi, A. and Opelz, G., Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013. 95: 19-47.
- 28 Hogue, C. W., Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem Sci* 1997. 22: 314-316.
- 29 Sun, Y., Liu, J., Yang, M., Gao, F., Zhou, J., Kitamura, Y., Gao, B., Tien, P., Shu, Y., Iwamoto, A., Chen, Z. and Gao, G. F., Identification and structural definition of H5-specific CTL epitopes restricted by HLA-A*0201 derived from the H5N1 subtype of influenza A viruses. *J Gen Virol* 2010. 91: 919-930.

Tables

Table 1: Characteristics of anti-HLA antibodies analyzed with depletion assay. Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibodies, Anti-nHLA: anti-native HLA antibodies, D: acid-treated condition, MFI: mean fluorescence intensity, N: non-treated condition

	Anti-dHLA (D\geq1.2N) n=28	Intermediate anti-nHLA (0.2N<D<1.2N) n=23	Prototypical anti-nHLA (D\leq0.2N) n=33
Patients (n)	17	16	19
Target cells (n)	16	11	11
HLA alleles (n)	20	13	19
A	7	8	5
B	10	4	10
C	3	1	4
Median N MFI	6289	11742	7330
Range N MFI	2318 - 13268	4597 - 21573	1626 - 21934
1st - 3rd quartiles N MFI	4542 - 8468	6806 - 15648	3278 - 11793
Median D MFI	10412	5872	65
Range D MFI	5489 - 17247	2848 - 19852	0 - 1814
1st - 3rd quartiles D MFI	9277 - 13597	4752 - 8614	2 - 467
Median D/N ratio	1.63	0.72	0.01
Range D/N ratio	1.20 - 6.78	0.21 - 1.19	0 - 0.17
1st - 3rd quartiles D/N ratio	1.44 - 1.90	0.40 - 1.02	0 - 0.04

Table 2: Comparison of depletion efficiency for the three categories of anti-HLA antibodies identified. Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibodies, Anti-nHLA: anti-native HLA antibodies, D: acid-treated condition, LSAB: Luminex single antigen beads, MFI: mean fluorescence intensity, N: non-treated condition

		Anti-dHLA (D\geq1.2N) n=28	Intermediate anti-nHLA (0.2N<D<1.2N) n=23	Prototypical anti-nHLA (D\leq0.2N) n=33
	Median (%)	85	23	11
	Range (%)	51 - 131	3 - 89	1 - 76
	1st - 3rd quartiles (%)	74 - 98	17 - 46	3 - 27
	<70%^a (n)	4	20	32
	Median (%)	91	69	NA
	Range (%)	71 - 120	12 - 113	NA
	1st - 3rd quartiles (%)	82 - 96	26 - 87	NA
	<70%^a (n)	0	13	NA

^a number of sera displaying a depletion ratio above 30%, i.e. a residual MFI after depletion below 70% of the non-depleted serum

Table 3: Epitope mapping for Case #1. Detailed report of Mean Fluorescence Intensity (MFI) values obtained with non-treated (N) and acid-treated (D) conditions, D/N ratios and residual MFI (%) after depletion on cells. Only positive Luminex Single Antigen Beads (LSAB) (N MFI ≥ 1000) are shown, the negative ones being summarized as median and quartiles. Alleles expressed on the cells used for serum depletion are underlined. In the D/N column, numerical values in bold type highlight the anti-dHLA (D/N ≥ 1.2). In the Residual MFI columns, bold typing highlights reactivities that were efficiently depleted (residual MFI<70%). In the Epitopes columns, the alleles displaying the identified epitopes are indicated with a cross.

Allele	N MFI	D MFI	D/N	Residual N MFI (%)	Residual D MFI (%)	Epitopes		
						#216 76ERN	#5024 (66I+70Q)	#6 161D
<u>B*07:02</u>	4469	7247	1.62	51	76	X	X	
B*42:01	4184	7378	1.76	60	74	X	X	
B*54:01	3385	7361	2.17	66	71	X	X	
B*55:01	3408	7342	2.15	50	76	X	X	
B*56:01	3054	5205	1.70	35	70	X	X	
B*67:01	4330	7514	1.74	49	82	X	X	
B*81:01	5487	7262	1.32	61	70	X	X	
B*82:01	4445	7720	1.74	63	70	X	X	
B*08:01	1883	295	0.16	15	ND	X		
B*15:01	1699	828	0.49	16	ND	X		
B*15:02	1500	363	0.24	14	ND	X		
B*15:03	1434	387	0.27	11	ND	X		
B*15:10	1714	338	0.20	16	ND	X		
B*15:11	1055	577	0.55	30	ND	X		
B*15:12	1572	734	0.47	16	ND	X		
B*14:01	1029	185	0.18	15	ND	X		
B*14:02	1048	42	0.04	20	ND	X		
B*18:01	1428	405	0.28	13	ND	X		
B*27:08	2856	623	0.22	16	ND	X		
<u>B*35:01</u>	1680	623	0.37	11	ND	X		
B*39:01	1950	560	0.29	12	ND	X		
B*40:01	3016	466	0.15	66	ND	X		
B*40:02	2470	576	0.23	17	ND	X		
B*40:06	1779	263	0.15	29	ND	X		
B*41:01	2004	586	0.29	16	ND	X		
B*45:01	1804	400	0.22	12	ND	X		
B*48:01	2455	612	0.25	15	ND	X		
B*50:01	1833	531	0.29	13	ND	X		
B*78:01	1629	544	0.33	20	ND	X		
<u>A*03:01</u>	3057	301	0.10	4	ND			X

Median (quartiles) of negative alleles	215 (0 - 468)	364 (176-555)	ND	ND	ND
---	------------------	------------------	----	----	----

Table 4: Epitope mapping for Case #2. Detailed report of Mean Fluorescence Intensity (MFI) values obtained with non-treated (N) and acid-treated (D) conditions, D/N ratios and residual MFI (%) after depletion on cells. Only positive Luminex Single Antigen Beads (LSAB) (N MFI ≥ 1000) are shown, the negative ones being summarized as median and quartiles. Alleles expressed by the cells used for serum depletion are underlined. In the D/N column, bold typing highlights the anti-dHLA ($D/N \geq 1.2$). In the Residual MFI columns, numerical values in bold type highlight reactivities that were efficiently depleted (residual MFI $< 70\%$). In the Epitopes columns, the alleles displaying the identified epitopes are indicated with a cross.

Allele	N MFI	D MFI	D/N	Residual N MFI (%)	Residual D MFI (%)	Epitope
						#5053 62QE
<u>A*01:01</u>	19198	19852	1.03	19	24	X
A*03:01	13885	15692	1.13	21	21	X
A*11:01	11438	14281	1.25	15	17	X
A*11:02	14328	16213	1.13	15	19	X
A*30:01	16408	15734	0.95	18	21	X
A*30:02	14296	15764	1.10	18	22	X
<u>A*31:01</u>	16828	18092	1.07	16	22	X
A*36:01	16914	14502	0.85	20	23	X
A*32:01	11636	16115	1.38	14	19	X
A*74:01	12893	15067	1.17	16	20	X
Median (quartiles) of negative alleles	44 (12 - 126)	139 (81-291)	ND	ND	ND	

Table 5: Epitope mapping for Case #3. Detailed report of Mean Fluorescence Intensity (MFI) values obtained with non-treated (N) and acid-treated (D) conditions, D/N ratios and residual MFI (%) after depletion on cells. Only positive Luminex Single Antigen Beads (LSAB) (N MFI ≥ 1000) are shown, the negative ones being summarized as median and quartiles. Alleles expressed by the cells used for serum depletion are underlined. In the D/N column, bold typing highlights the anti-dHLA (D/N ≥ 1.2). In the Residual MFI columns, numerical values in bold type highlight reactivities that were efficiently depleted (residual MFI $<70\%$). In the Epitopes columns, the alleles displaying the identified epitopes are indicated with a cross.

Allele	N MFI	D MFI	D/N	Residual N MFI (%)	Residual D MFI (%)	Epitope
						(67S)
B*13:01	3350	9163	2.74	91	83	X
B*13:02	4622	10472	2.27	87	78	X
B*15:01	6939	12113	1.75	98	76	X
B*15:02	5760	11851	2.06	99	81	X
B*15:03	5318	13172	2.48	89	85	X
B*15:12	6587	12791	1.94	91	86	X
B*15:13	7856	10028	1.28	94	84	X
B*18:01	8991	13438	1.49	98	102	X
<u>B*37:01</u>	11480	13761	1.20	84	83	X
B*40:01	7322	11910	1.63	94	80	X
B*40:02	4022	11953	2.97	96	87	X
B*40:06	5333	10948	2.05	91	83	X
B*41:01	7946	12405	1.56	92	83	X
B*44:02	9644	12671	1.31	96	79	X
B*44:03	4670	8987	1.92	90	87	X
B*45:01	7156	12701	1.77	92	81	X
B*47:01	8903	11430	1.28	90	83	X
B*48:01	9899	13138	1.33	92	81	X
B*49:01	2741	9332	3.40	89	78	X
B*50:01	5348	12139	2.27	100	85	X
B*52:01	9366	111215	1.20	86	81	X
Median (quartiles) of negative alleles	41 (12 - 79)	33 (11-69)	ND	ND	ND	

Figures Legends

Figure 1: Native and denatured class I HLA expression on cells used for antibody depletion assays.

Panel 1A: Gating strategy used for FACS analysis of native (W6/32 mAb, continuous line) and denatured (HC-10 mAb, dotted line) class I HLA expression of PBL and T cell lines used for the depletion experiments. PBL from 4 donors and two T-lymphocyte cell lines are presented. The shaded gray histogram depicts the isotype-matched negative control antibody.

Panel 1B: Normalized Mean Fluorescence Intensity (MFI) (i.e. after subtraction of the isotype-matched negative control antibody MFI value) obtained with W6/32 and HC-10 staining on 19 of the 21 PBL and T-lymphocyte cell lines used for depletion experiments. The boxes depict the median and the first and third quartiles. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. FSC: Forward Scattered light, MFI: mean fluorescence intensity, SSC: Side Scattered light.

Figure 2: Efficiency of antibody depletion measured with non-treated LSAB. Mean Fluorescence Intensity (MFI) values obtained on non-treated Luminex Single Antigen Beads (LSAB) with 35 sera, before and after depletion with 21 different cells, are represented for prototypic anti-native HLA (anti-nHLA) (panel 2A, n=33), intermediate anti-nHLA (panel 2B, n=23) and anti-denatured HLA (anti-dHLA) (panel 2C, n=28). The efficiency of depletion is expressed as the residual MFI percentage calculated from the MFI obtained on LSAB after depletion divided by the MFI measured before depletion, and is compared for these three categories (panel 2D, x-axis: D = anti-dHLA, I = intermediate anti-nHLA and N = prototypic anti-nHLA, *: Kruskal-Wallis test $p < 0.05$). The boxes depict the median, and the first and third quartiles. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. D: acid-treated condition, N: non-treated condition.

Figure 3: Comparison of antibody depletion efficiency measured on non-treated and acid-treated LSAB for anti-dHLA and intermediate anti-nHLA. Serum anti-HLA

antibody depletion experiments were performed on PBMC and T-lymphocyte cell lines. The efficiency of depletion is expressed as the residual Mean Fluorescence Intensity (MFI) percentage calculated from the MFI obtained on Luminex Single Antigen Beads (LSAB) after depletion divided by the MFI measured before depletion, and is represented for anti-denatured HLA (anti-dHLA) (panel 3A, n=28) and for intermediate anti-native HLA (anti-nHLA) (panel 3B, n=23) on non-treated and acid-treated LSAB. D: acid-treated condition, N: non-treated condition.

Figure 4: Mapping of amino acids targeted by the anti-HLA described in Cases #1 to #3.

Amino acid localization on class I HLA molecule represented with the “space fill” command of the Cn3D structure software program, using HLA-A*02:01 as a structural model (MMDB ID: 82223, PDB ID: 3MGT). The HLA heavy chain, beta-2 microglobulin and peptide are colored in purple, blue and brown respectively. Amino acid positions of interest are highlighted in yellow and hidden amino acid positions on the native molecule are given in parentheses.

Figure 1

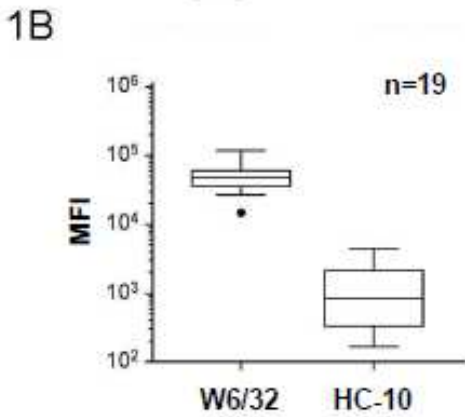
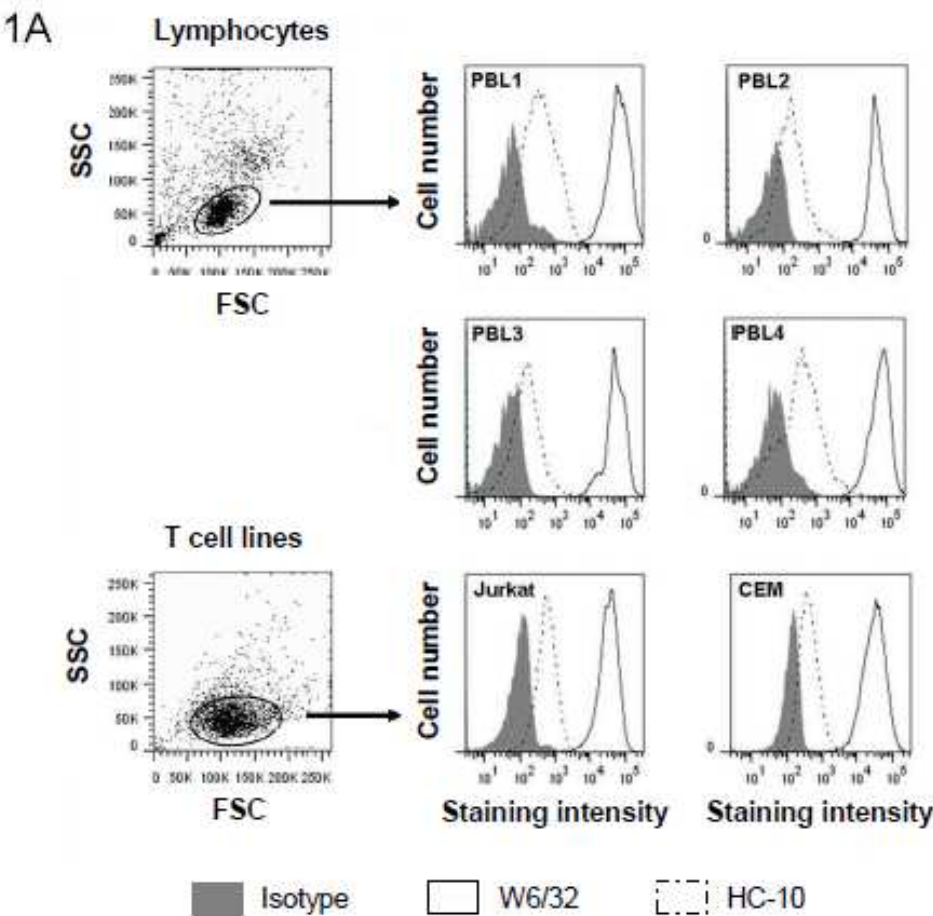


Figure 2

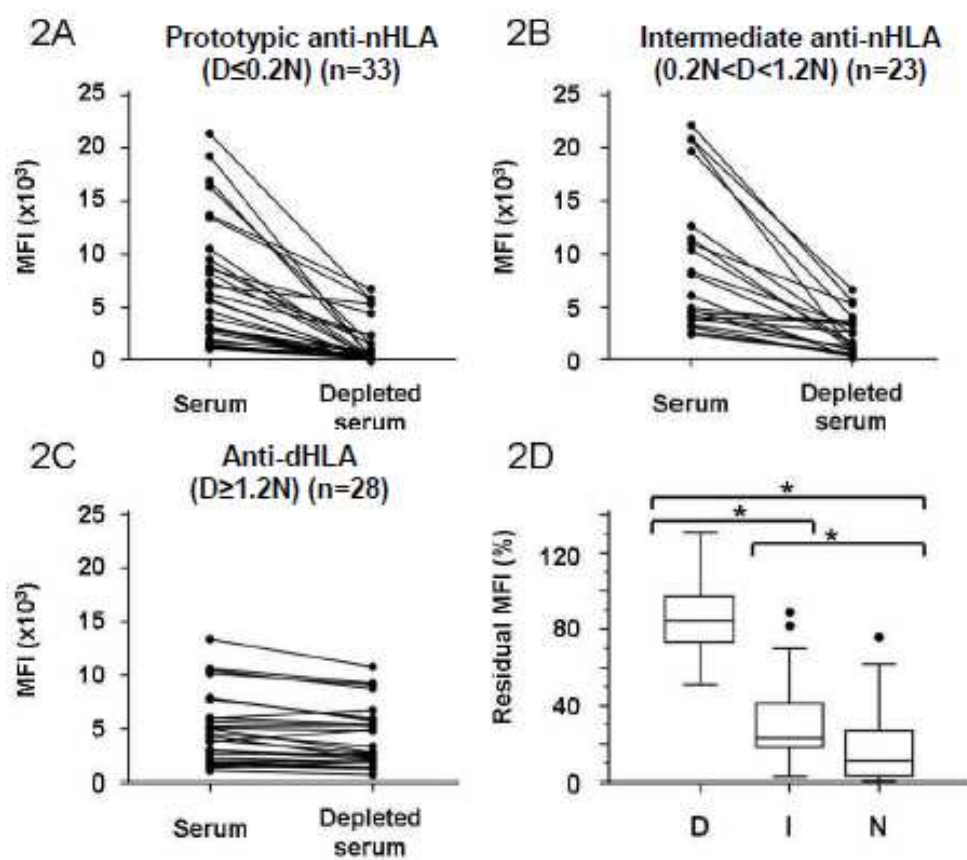


Figure 3

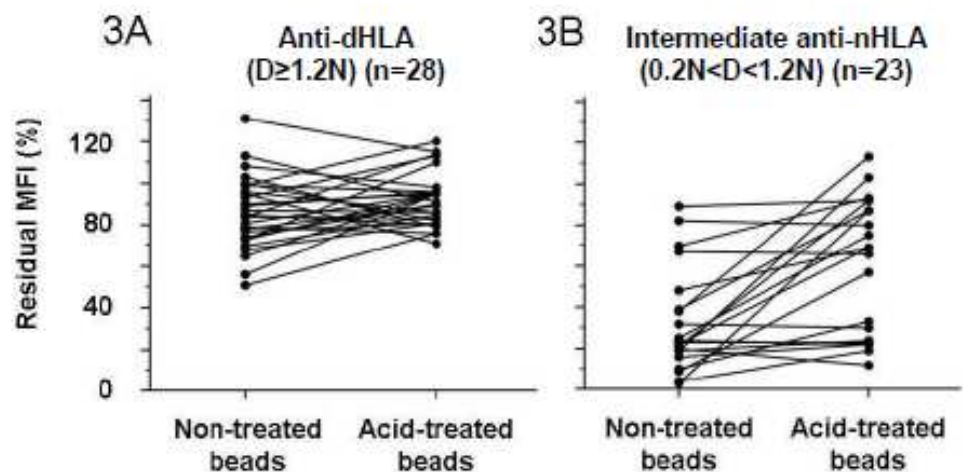
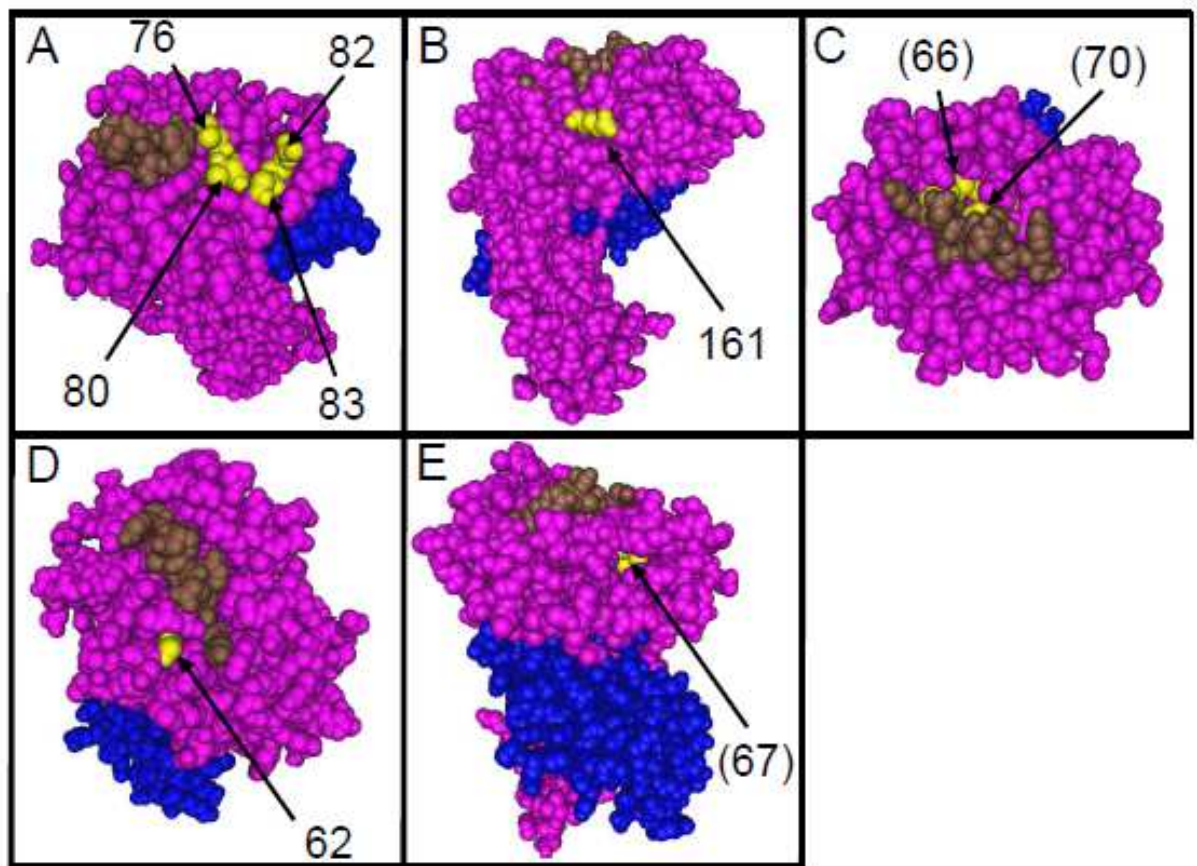


Figure 4



VI-3 – Troisième article : Evaluation des iBeads pour la détection des anticorps anti-HLA de classe I

Article publié dans la revue *Human Immunology*

« **Evaluation of the iBeads assay as a tool for identifying class I HLA antibodies** »

Jonathan Visentin, Gwendaline Guidicelli, Thoa Nong, Jean-François Moreau, Pierre Merville, Lionel Couzi, Jar-How Lee and Jean-Luc Taupin.

Présentation et objectifs du travail

Ce travail fait suite aux deux articles précédents. Notre but était d'analyser de manière plus précise et sur un plus grand échantillon la correspondance entre les résultats obtenus avec les billes SAG classe I, le traitement acide de ces billes, le XM CMF et les iBeads® afin de valider l'utilisation des iBeads® en routine hospitalière. En effet, à cette époque, les iBeads® n'étaient utilisables qu'à des fins de recherche. Cela permettait également de valider les informations obtenues avec le traitement acide et les XM CMF.

Mon rôle dans cette étude a consisté en l'analyse statistique des données envoyées par One Lambda, Inc., et obtenues à partir des sérums utilisés pour le premier article (280 testés sur les 323 de la première étude), à réaliser une partie des choix des couples cellules/sérums à tester en XM CMF puis à rédiger l'article.

Concernant l'identification des anti-nHLA et des anti-dHLA, nous avons observé une concordance de 86,9% entre les iBeads® et le traitement acide des billes (Figure 1). Tous loci confondus, les iBeads® donnaient des MFI inférieures aux billes SAG classiques (Figure 2, panel A), que ce soit avant ou après élimination des anti-dHLA définis par le traitement acide (Figure 2, panels B et C). L'étude des billes montrant une MFI inférieure à 3000 en SAG classique indiquait que cette différence pouvait n'avoir que peu d'impact clinique (Figure 2, panels D à F), car inférieure à 300 unités de fluorescence en moyenne. Nous avons étendu cette étude au niveau de chaque locus et mis en évidence que les iBeads® étaient plus efficaces pour s'affranchir des anti-dHLA reconnaissant des molécules HLA-B et -C en comparaison à HLA-A (Table 1). A l'inverse, la réactivité des anti-nHLA était mieux conservée pour les antigènes HLA-A que pour HLA-B et -C (Table 1, Figure 3). Par ailleurs, les différents allèles HLA d'un même locus montraient une certaine hétérogénéité dans leur comportement (Supplemental Tables 1 à 3). A partir des 299 XM CMF que nous avons pu réaliser, nous avons confirmé qu'une MFI à 1000 pour les iBeads® permettait de prédire la positivité d'un XM avec une sensibilité (95,6%) et un rapport de vraisemblance négatif (0,08) satisfaisants. Dans cette étude, les iBeads® semblaient plus performantes que le traitement acide, mais la combinaison des deux tests permettait une prédiction encore meilleure.

Title: Evaluation of the iBeads assay as a tool for identifying class I HLA antibodies

Authors: Jonathan VISENTIN^{1,2}, Gwendaline GUIDICELLI¹, Thoa NONG³, Jean-François MOREAU^{1,2}, Pierre MERVILLE^{2,4}, Lionel COUZI⁴, Jar-How LEE³ and Jean-Luc TAUPIN^{1,2}.

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

²UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

³One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA

⁴Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Address for correspondence:

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel +33 5-57-82-08-84 / Fax +33 5-56-79-60-79

Email jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Abbreviated title: iBeads for identifying class I HLA antibodies

Conflict of interests: T.N. and J.L. are employees of One Lambda Inc. No specific funding was obtained for this study. The class I SAFB assays in acid-denatured condition for the patients with DSA in non-treated condition, and the iBeads assays were performed in One Lambda's research department as a scientific collaboration, with reagents and equipments provided by One Lambda Inc and by staff people employed by One Lambda Inc.

The other authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Abstract

In addition to antibodies targeting native class I human leukocyte antigens (HLA), the single antigen flow beads assay (SAFB) detects antibodies recognizing denatured forms (anti-dHLA). Acid treated SAFB and the modified SAFB reagent named iBeads are expected to distinguish anti-native (anti-nHLA) from anti-dHLA. Sera from 280 class I HLA-sensitized SAFB-positive kidney transplant candidates were retested with acid-treated SAFB and iBeads. Concordance between SAFB and iBeads, taking into account acid-treatment results, was described at global and locus levels. T-lymphocyte flow cytometry crossmatches (FCXM) were performed to identify an accurate iBeads MFI threshold allowing predicting FCXM results. Concordance between acid-treatment and iBeads assays was observed for 86.9% of alleles. The iBeads MFI were lower than for classical SAFB, especially for HLA-B and C alleles. Anti-dHLA identified with acid-treated SAFB were more frequently negative with iBeads for HLA-B and -C alleles. An iBeads MFI threshold of 1000 allowed predicting positive FCXM with 95.6% sensitivity, 91.6% negative predictive value and 0.08 negative likelihood ratio. The iBeads assay still has limitations, but might represent an invaluable alternative to SAFB for virtual crossmatch strategies in organ transplant allocation programs.

Keywords: HLA antibodies, denatured HLA antibodies, iBeads, kidney transplantation

Abbreviations:

anti-dHLA: anti-denatured HLA antibody(ies)

anti-nHLA: anti-native HLA antibody(ies)

B2m: beta 2-microglobulin

dHLA: denatured class I HLA

D-SAFB: acid-treated SAFB

FCXM: flow cytometry crossmatch

FHC: free class I HLA heavy chains

MFI: mean fluorescence intensity

nHLA: native class I HLA

N-SAFB: non-treated SAFB

SAFB: single antigen flow bead(s)

1. Introduction

Nowadays, the single antigen flow bead (SAFB) assay has become the most used technique to define acceptable class I and class II HLA antigens in organ allocation programs. Indeed, it allows anticipating the pretransplant crossmatch results with a virtual crossmatch strategy, thanks to its unprecedented high sensitivity and resolution [1, 2]. For the same reasons, it occupies a central place in diagnosis and monitoring of antibody-mediated rejection after transplantation [3-5].

However, it has been recently discovered that SAFB display not only native class I HLA (nHLA), consisting of correctly folded heterotrimers of class I heavy chain, beta 2-microglobulin (B2m) and peptide, but also denatured class I HLA (dHLA), i.e. free class I HLA heavy chain (FHC) dissociated from B2m and peptide, and that dHLA can be targeted by serum antibodies [6, 7]. Differentiating anti-nHLA from anti-dHLA antibodies has been rendered possible with the concomitant use of acid-treated SAFB (D-SAFB) and classical, non-treated SAFB (N-SAFB) [6-10], which recently allowed us describing the prevalence and allele/antigen distribution of anti-dHLA in a large cohort of kidney awaiting recipients [11]. For this purpose, we established a local threshold for anti-dHLA definition, relying on the ratio between SAFB mean fluorescence intensity (MFI) with D-SAFB and N-SAFB equal to or higher than 1.2 (i.e. anti-dHLA and anti-nHLA displaying $D \geq 1.2N$ and $D < 1.2N$, respectively) [11]. The accuracy of this threshold was confirmed with a T-cell flow cytometry crossmatch (FCXM) assay, as anti-dHLA are not expected to recognize HLA molecules expressed by normal cells [11]. By associating a large cohort of patients and a cell-based assay, our results strengthened the scarce previously published data and mostly relying on case reports that antigens targeted by anti-dHLA should not be taken for granted as unacceptable in most cases.

A modified assay largely devoid of denatured class I HLA through enzymatic treatments of the SAFB (iBeads, One Lambda Inc., Canoga Park, CA) has recently been developed, and was suggested to distinguish clinically relevant DSA (i.e. iBeads-positive) from clinically irrelevant ones (i.e. iBeads-negative) [9]. Accordingly, we demonstrated that acid-treatment assay and iBeads at least in part identified the same antibodies recognizing denatured HLA molecules, and we have shown that iBeads were more selective towards antibodies able to trigger FCXM positivity than SAFB [11]. However, iBeads appeared not strictly specific for anti-nHLA, as they could still detect FCXM-negative anti-HLA antibodies identified as anti-dHLA, and some FCXM-positive anti-nHLA were iBeads-negative. Noteworthy, locus specificity of these drawbacks has not been evaluated yet.

The objectives of the present study were therefore to, 1) describe in a larger cohort of class I HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant the concordance between SAFB and iBeads assays at a global level, taking into account results from acid-treatment assay, 2) perform the same analysis at the locus level, 3) define for iBeads a MFI threshold allowing accurate prediction of FCXM results for the purpose of a routine use.

2. Materials and methods

2.1 Patients, donors, and sera

All the 336 class I HLA-sensitized patients enrolled on our adult kidney waiting list between January 2000 and March 1st 2011 were eligible, but 24 (7.1%) were excluded because of high background in SAFB assay and/or iBeads assays [22 (6.5%) with both assays, 1 (0.3%) with iBeads only and 1 (0.3%) with SAFB only], and 32 (9.5%) because no serum was available anymore. The final study group included 140 women and 140 men, among whom 251 [90%, with 135 (96%) women and 116 (83%) men] had faced at least one sensitizing event such as transplantation [58 (41%) and 104 (74%)], transfusion [75 (54%) and 74 (53%)] or pregnancy [101 (72%)]. Among them, 173 (62%) were also class II sensitized. One pre transplant serum was studied for each patient, chosen at a class I sensitization peak as defined by complement-dependent cytotoxicity PRA, Luminex[®] PRA or Luminex[®] SAFB assays, for patients transplanted between 2000 and 2004, 2005 and 2008, 2009 and February 2011, respectively, and at a peak Luminex[®] SAFB assay for the patients still awaiting a transplant on March 1st 2011. Low and high resolution (when required) donor HLA-A, -B, -C typing was performed with DNA techniques (respectively Olerup SSP, Stockholm, Sweden, and High Resolution Labtype SSO, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA).

2.2 Definition of anti-dHLA and anti-nHLA antibodies with SAFB assays

Sera were tested retrospectively with classical SAFB (Lot 006) in non-treated condition and iBeads (Lot 001) (One Lambda, Inc.) according to manufacturer's recommendations for routine assay use. Both assays explore the same 97 HLA-A, B and C alleles (listed in Supplemental Tables 1 to 3, respectively). MFI values were normalized using

the baseline formula (Fusion[®] software, One Lambda, Inc.). Our local pre transplant positivity threshold defining unacceptable antigens was applied ($\text{MFI} \geq 1000$). Denaturation of classical SAFB and subsequent assay with sera were performed as previously described [11]. Samples with high background in any of the assays, i.e. providing raw MFI above 500 with negative control bead were not considered in the study. Consistency of denaturation was ascertained with a positive control serum containing only anti-nHLA. Classification of positive beads into anti-dHLA ($D \geq 1.2N$) or anti-nHLA ($D < 1.2N$) categories was performed as previously described [11].

2.3 T-lymphocyte FCXM assay

The FCXM was performed on freshly drawn total lymph node or spleen mononuclear cells from consecutive deceased organ donors tested for compatibility with our wait-list patients, with the routine four-color staining protocol previously described [12]. Sera were selected to react with non-treated SAFB against only one unacceptable HLA-A, -B or -Cw donor antigen, with a minimal MFI about 2000 with N-SAFB or iBeads assay, as in our experience FCXM are frequently negative below this value. The positivity threshold for T-lymphocytes was at a mean channel shift value of 50 above the negative control, which is a serum pool from AB group non allosensitized donors.

2.4 Statistical analysis

Descriptive statistics used median and 5th-95th percentiles; study of qualitative variables used the two-tailed Chi-square test, and independent quantitative variables the two-tailed Mann–Whitney U test or the Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison of subgroups according to Conover. MFI difference between N-SAFB and iBeads were represented with Bland-Altman plots. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was used to determine optimal threshold identifying non relevant antibodies with the method of DeLong

et al. (1988) for calculation of the Standard Error of the Area Under the Curve. Analyses were performed with MedCalc[®] software (Mariakerke, Belgium).

3. Results

3.1 Description of class I anti-HLA antibodies defined with acid-treatment and iBeads assays

Among the 27160 alleles tested with the 280 sera included in this study, 7831 (28.8%) were positive ($\text{MFI} \geq 1000$) with N-SAFB and/or with iBeads [7553 (27.8%) positive with N-SAFB and 6593 (24.3%) with iBeads] (Figure 1). According to the MFI ratio between the D-SAFB and N-SAFB assays, 469 (6.2%) alleles were defined as recognized by anti-dHLA ($D \geq 1.2N$) and 7084 (93.8%) by anti-nHLA ($D < 1.2N$). Among the anti-dHLA, 109 (23.2%) and 360 (76.8%) were positive and negative with iBeads, respectively, while 6206 (87.6%) and 878 (12.4%) anti-nHLA were positive and negative with iBeads, respectively (chi-square test, $p < 0.0001$). Hence concordance between the two assays was observed for 86.9% of the alleles. Moreover, 278 (4.2%) of positive iBeads were negative with N-SAFB, with an iBeads median MFI of 1401 (5th-95th percentiles 1027-3226). Noteworthy, iBeads-negative anti-dHLA had higher MFI than iBeads-negative anti-nHLA (anti-dHLA median MFI 1949, 5th-95th percentiles 1038-7856 and anti-nHLA median MFI 1405, 5th-95th percentiles 1036-3407, $p < 0.0001$).

3.2 Differences in MFI strength between iBeads and classical SAFB

We built Bland-Altman plots in order to compare MFI values measured with N-SAFB and iBeads assays, considering altogether from all loci the alleles that were positive with at least one assay. We observed a bias of MFI values with a tendency to underestimation for iBeads (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 856, $n=7831$, Figure 2A). The bias was higher considering anti-dHLA only (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 2608, $n=477$, Figure 2B) and persisted, although to a lower extent, when we considered only anti-nHLA (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 742, $n=7354$, Figure 2C). Accordingly, MFI measured for the

positive control serum, which was a mix of sera from 2 HLA-sensitized recipients containing only anti-nHLA and providing $\text{MFI} \geq 1000$ for 78 alleles, were generally lower with iBeads (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 1241, Supplemental Figures 1 and 2). We repeated this analysis with the low MFI alleles, i.e. not higher than 3000 with SAFB or with iBeads when SAFB was negative. We still observed a bias of MFI values with a tendency to underestimation for iBeads (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 384, $n=2906$, Figure 2D). As above, the bias was higher considering anti-dHLA only (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 1336, $n=289$, Figure 2E), and persisted, although to a lower extent, when we considered only anti-nHLA (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 279, $n=2617$, Figure 2F).

3.3 Heterogeneity of inter-locus behavior towards iBeads

We then studied the locus-per-locus distribution of positive alleles with N-SAFB and iBeads assays, whether they were recognized by anti-dHLA, anti-nHLA or positive with iBeads only. Anti-dHLA were more frequently negative with iBeads for HLA-B and -C than for HLA-A alleles ($p < 0.0001$). Anti-nHLA were more frequently positive with iBeads for HLA-A than for HLA-B, than for HLA-C alleles ($p < 0.0001$). Alleles negative with N-SAFB and positive with iBeads were also more frequent for HLA-A than for HLA-B and HLA-C alleles ($p < 0.0001$) (Table 1). We then built Bland-Altman plots in order to compare the MFI values measured with N-SAFB and iBeads assays, after separating HLA-A, -B and -C alleles defined as anti-nHLA or positive with iBeads only. We observed a bias of MFI values with a tendency to underestimation for iBeads which was higher for HLA-C alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 1454, $n=714$) than for HLA-B alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 888, $n=4266$), than for HLA-A alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 274, $n=2422$) (Figure 3, left panel, $p < 0.05$). We then repeated the analysis for alleles with low MFI values, i.e. not higher than 3000 with N-SAFB or with iBeads when N-SAFB were negative. We also observed a bias of MFI values with a tendency to underestimation for iBeads which was

higher for HLA-C alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 763, n=290), than for HLA-B alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 328, n=1499), than for HLA-A alleles (mean N-SAFB MFI - iBeads MFI = 19, n=828) (Figure 3, right panel, $p < 0.05$). The allele-per-allele distribution and mean N-SAFB MFI - iBeads MFI are also available for the HLA-A, -B and -C loci as Supplemental Tables 1, 2 and 3, respectively. Some alleles had a peculiar behavior with iBeads in comparison with other alleles from the same locus, but we could not evidence any specific epitopes explaining this result.

3.4 Determination of a MFI threshold for iBeads assay using T-lymphocyte FCXM

Using lymphocytes obtained from 115 organ donors, 299 T-lymphocyte FCXM assays were performed with 129 different sera where a unique unacceptable HLA-A, -B or -Cw donor antigen was recognized by an anti-dHLA (n=97, median N-SAFB MFI 4670, 5th-95th percentiles 2145-12159), an anti-nHLA (n=195, median N-SAFB MFI 8307, 5th-95th percentiles 2270-18850) or with iBeads only (n=7, median iBeads MFI 3316, 5th-95th percentiles 1992-6901) (Table 2). A total of 51 different antigenic specificities were tested: 18 HLA-A, 29 HLA-B and 4 HLA-Cw. A serum could be tested against several different antigens (median 2, 5th-95th percentiles 1-5) but only once against any given one. Using a ROC-curve analysis, we determined a threshold for iBeads MFI allowing predicting T-lymphocyte FCXM positivity. The area under curve was 0.92 (95% confidence interval: 0.88-0.95, $p < 0.0001$). A positivity threshold of MFI 1000 for iBeads allowed defining antibodies able to provide a positive FCXM with 95.6% sensitivity, 53.9% specificity, 69.9% and 91.6% positive and negative predictive values, and 2.07 and 0.08 positive and negative likelihood ratios. One antigen positive with iBeads but negative with N-SAFB provided a positive crossmatch among the seven tested.

As a comparison, the performance of the acid-treatment assay was slightly lower, as it showed an area under curve of 0.80 (95% confidence interval: 0.75-0.85, $p < 0.0001$), and the

$D \geq 1.2N$ threshold provided 90.4% sensitivity, 60.7% specificity, 72.8% and 84.5% positive and negative predictive values, and 2.30 and 0.16 positive and negative likelihood ratios. Finally, combining acid-treatment and iBeads assays, i.e. defining an irrelevant antibody with $D \geq 1.2N$ and iBeads MFI < 1000, provided 98.1% sensitivity, 41.1% specificity, 65.1% and 95.1% positive and negative predictive values, and 1.67 and 0.05 positive and negative likelihood ratios.

4. Discussion

In this study, we confirmed with a larger cohort the findings from our previous work, i.e. that most of the anti-dHLA defined with acid-treatment of SAFB were iBeads negative [11], with about 87% of concordance. However, the existence of discrepancies between the two assays, i.e. iBeads-positive anti-dHLA and iBeads-negative anti-nHLA, raised the hypothesis that one of the two assays, or both, could fail in identifying such antibodies.

A fraction of authentic anti-dHLA was indeed unexpectedly iBeads-positive. A possible explanation is that the proteolytic enzymatic treatments used to prepare the iBeads do not destroy all the dHLA molecules. In line with this, whereas iBeads were described as being largely devoid of denatured HLA molecules, a careful analysis of iBeads staining with the HC-10 monoclonal antibody, known to target class I HLA FHC, indicates that a little amount of dHLA still persists on their surface [9]. Alternatively, these sera could contain mixtures of anti-nHLA and anti-dHLA reactivities targeting the same allele. In such case, if serum reactivity against nHLA is weaker than against dHLA, the loss of anti-nHLA reactivity after acid treatment could be masked by the increased anti-dHLA reactivity. Then an allele could be erroneously tagged as targeted by an anti-dHLA only whereas it is also truly recognized by an anti-nHLA. Experiments are underway to confirm this hypothesis.

A fraction of authentic anti-nHLA was also iBeads-negative. One could hypothesize that some nHLA molecules might be wiped out with the enzymatic treatments, leaving the iBeads with a lower nHLA density than the classical SAFB and rendering them less sensitive. Indeed, it has been described that MFI values obtained with W6/32 staining are lower with iBeads than with N-SAFB [9]. These authors reported the same observation with patients' sera, but unfortunately without discriminating anti-dHLA from anti-nHLA, which could have led to "overestimate the underestimation". Here we showed that indeed iBeads MFI were

lower than N-SAFB MFI, whether or not anti-dHLA were subtracted from the analysis. Then, as the MFI difference between the two assays could depend on the MFI level, and because an absolute MFI variation of 700 units could be even more meaningful for low than for high MFI alleles, we repeated the analysis for low MFI alleles ($\text{MFI} \leq 3000$) and observed that the underestimation persisted, although to a lower extent.

Interestingly, the separate analysis of HLA-A, -B and -C loci highlighted heterogeneous behaviors towards iBeads as anti-dHLA targeting A antigens were globally less efficiently ignored by iBeads than those targeting B and C molecules. Similarly, anti-nHLA had their MFI globally more conserved for HLA-A than for HLA-B and -C. Hence it seemed that both dHLA and nHLA molecules were more resistant to enzymatic treatments for HLA-A alleles than for HLA-B and -C. Noteworthy, we ruled out the hypothesis that the ability of iBeads to ignore anti-dHLA was directly linked to their lower sensitivity, as iBeads-negative anti-dHLA had higher MFI than iBeads-negative anti-nHLA. Noteworthy, a minor fraction of iBeads-positive alleles were surprisingly negative with N-SAFB. Unfortunately, as their MFI were generally low, we could not perform a sufficient number of informative FCXM to precisely determine their relevance.

We finally defined for iBeads a $\text{MFI} \geq 1000$ threshold allowing predicting positive FCXM results with a sufficient sensitivity to be applied to the clinical routine setting. The acid-treatment assay relying on the previously defined $\text{D} \geq 1.2\text{N}$ threshold showed a slightly lower sensitivity [11]. Interestingly, the combination of both assays provided even higher sensitivity, suggesting that the limitations and/or drawbacks of each assay could be counterbalanced by the other one.

Noteworthy, selecting sera to be tested for having a $\text{MFI} \geq 2000$ with N-SAFB or iBeads assay could have introduced a bias against FCXM negative results, leading to artificially lowering number of true negative and false negative results. However, where the vast majority of the 299 antigens assayed displayed a classical SAFB $\text{MFI} \geq 2000$ (290/299,

i.e. 97.0%), 83/299 (27.8%) of them displayed an iBeads MFI \leq 1000. Then, this pre-selection should not have affected our evaluation of the iBeads assay. This was confirmed by the very good negative likelihood ratio observed, this parameter being less likely to change with the prevalence of the “positive FCXM event” than sensitivity and negative predictive value, in the population studied. As a conclusion, our results indicated that acid-treatment of classical SAFB and iBeads indeed identified in most cases the same antibodies recognizing dHLA molecules. Each assay has its drawbacks but iBeads provide a direct answer, whereas the acid-treatment provides an indirect one by eliminating the anti-nHLA, precisely those antibodies that should not be missed.

The iBeads assay is more user-friendly, as it provides in one step a better estimation of the anti-nHLA profile of a serum, while the classical SAFB assay requires to be performed with both non-treated and acid-treated beads to obtain this information. This latter strategy would therefore double the workload both for completing the experiments and interpreting the profiles. Therefore, the iBeads assay at a price in the same range as the classical SAFB assay, would be cost-effective.

However, one must keep in mind that iBeads display a lower sensitivity than classical SAFB, especially for HLA-B and HLA-C alleles. Therefore, no definitive solution yet exists to reach the ultimate objective of an acellular specific and sensitive prospective pre transplant virtual crossmatch assay, but combining the iBeads assay with a sensitive crossmatch such as the FCXM might be an invaluable alternative.

5. Acknowledgments

We acknowledge Catherine Rio, transplant coordinator nurse, for her valued assistance. We are grateful to the technicians of the immunology laboratory, for their technical expertise.

6. Author contributions

J.T. and J.V.: study design. J.V., G.G., T.N., J.M., P.M., L.C., J.L. and J.T.: performance of the research. J.V. and J.T.: data analysis. J.V. and J.T.: writing of the article. G.G., J.M., P.M., L.C. and J.L.: critical revision of the manuscript.

References

1. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, Guasch A, Tso P, Mendel JB, Gebel HM: Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant* 2006; 6: 2307-2315.
2. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS: Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am J Transplant* 2011; 11:719-724.
3. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, Goldberg A, Birk PE, Rush DN, Nickerson PW: Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012; 12: 1157-1167.
4. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, Sellares J, Reeve J, Halloran PF: De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2532-2541.
5. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schmidt D, Salama A, Schonemann C: Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009; 87: 1505-1513.
6. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J: "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111-1115.
7. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, Maruya E, Poli F: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009; 70: 844-853.

8. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schonemann C: Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009; 88: 226-230.
9. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, van Eck M, van Ginkel WG, Hene RJ, van Zuilen AD: The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2013; 173: 536-543.
10. Nikaein A, El-Awar N, Hunt J, Rosenthal EJ, Eichhorn E, Hall S, Boehrer J, Magee M, Pieniek M, Brinkman W, Dewey T: Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31: 443-447.
11. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, Dubois V, Moreau JF, Lee JH, Couzi L, Merville P, Taupin JL: Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation. *Transplantation* 2014; 98: 738-744.
12. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D, Robert G, Wallerand H, Moreau JF, Taupin JL, Merville P: Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91:527-535.

Table 1: Inter-locus comparison of serum behavior towards iBeads. Positive alleles with N-SAFB (MFI $N \geq 1000$) were categorized according to the MFI ratio between D-SAFB and N-SAFB conditions, and were classified according to their positivity with iBeads and their locus. Some alleles were positive with iBeads only.

		N-SAFB positive		N-SAFB positive		N-SAFB positive	
		HLA-A alleles		HLA-B alleles		HLA-C alleles	
All positive alleles		n=2430		n=4339		n=784	
n=7831		iBeads-	iBeads-	iBeads-	iBeads-	iBeads-	iBeads-
		positive	negative	positive	negative	positive	negative
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
N-SAFB positive alleles	Anti-dHLA	68	84	31	197	10	79
	n=469	(44.7)	(55.3)	(13.6)	(86.4)	(11.2)	(88.8)
	Anti-nHLA	2100	178	3597	514	509	186
	n=7553	(92.2)	(7.8)	(87.5)	(12.5)	(73.2)	(26.8)
iBeads-positive alleles only		144		115		19	
n=278		(6.2)		(3.1)		(3.5)	

Table 2: Flow cytometry crossmatch analysis of anti-dHLA, anti-nHLA, iBeads-positive and iBeads-negative antibodies. The FCXM was performed on freshly drawn total lymph node or spleen mononuclear cells from consecutive deceased organ donors. Sera were selected to react with N-SAFB against only one unacceptable HLA-A, -B or -Cw donor antigen. The positivity threshold for T-lymphocytes was at a mean channel shift value of 50 above the negative control, which is a serum pool from AB group non allosensitized donors.

		Positive	Negative
		crossmatch (%)	crossmatch (%)
Acid-treatment assay	D\geq1.2N		
	n=97	15 (15.5)	82 (84.5)
	D<1.2N		
	n=195	142 (72.8)	53 (27.2)
iBeads assay	iBeads MFI<1000		
	n=83	7 (8.4)	76 (91.6)
	iBeads MFI\geq1000		
	n=216	151 (69.9)	65 (30.1)
Acid-treatment and iBeads assays combination	D\geq1.2N and iBeads MFI<1000		
	n=61	3 (4.9)	58 (95.1)
	D<1.2N or iBeads MFI\geq1000		
	n=238	155 (65.1)	83 (34.9)

Figure Legends

Figure 1: Distribution of class I anti-HLA antibodies according to N-SAFB, acid-treatment and iBeads assays. Sera from class I HLA-sensitized patients were tested with N-SAFB, D-SAFB and iBeads. Alleles found positive ($\text{MFI} \geq 1000$) with N-SAFB were categorized according to the D-SAFB/N-SAFB MFI ratio and were classified according to their positivity with iBeads. Some alleles were positive with iBeads only. Percentages in *italic* represent distribution of $D \geq 1.2N$ and $D < 1.2N$ alleles for the iBeads negative and positive categories. Percentages between square brackets represent distribution of iBeads positive alleles among $D \geq 1.2N$, $D < 1.2N$ and N-SAFB negative categories.

Figure 2: Comparison of MFI values provided by N-SAFB and iBeads assays. Bland-Altman plots represent MFI difference between N-SAFB and iBeads according to MFI obtained with N-SAFB, for all (Panels A to C) or only the weak (Panels D to F) ($\text{MFI} \leq 3000$) N-SAFB positive alleles. Full and dashed lines represent the mean of MFI difference and 1.96 mean standard deviation, respectively. Panels A and D, B and E, then C and F depict all the alleles positive with at least one of the two assays, the anti-dHLA only, then the anti-nHLA and those positive with iBeads but negative with N-SAFB, respectively.

Figure 3: Interlocus heterogeneity of MFI differences between N-SAFB and iBeads. Repartition of mean MFI differences between N-SAFB and iBeads among HLA-A, -B and -C loci. The left panel describes the alleles positive with one of the two assays and the right panel describes the N-SAFB weak positive alleles ($\text{MFI} \leq 3000$), and those positive with iBeads but negative with N-SAFB. The box depicts the median and the first and third quartiles. The vertical line encompasses the range, the "outlier" values being displayed as

dots.*= $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison of subgroups according to Conover.

FIGURE 1

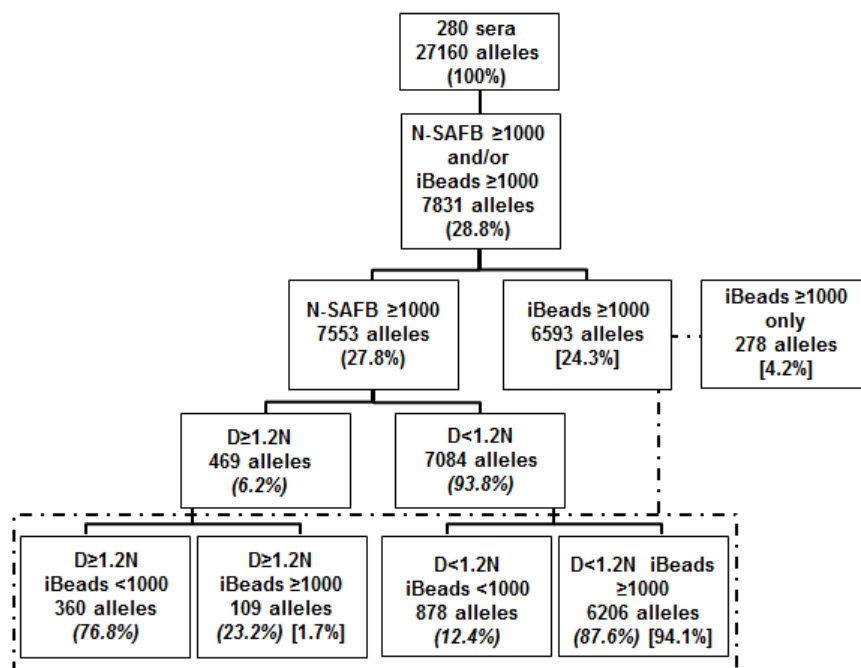


FIGURE 2

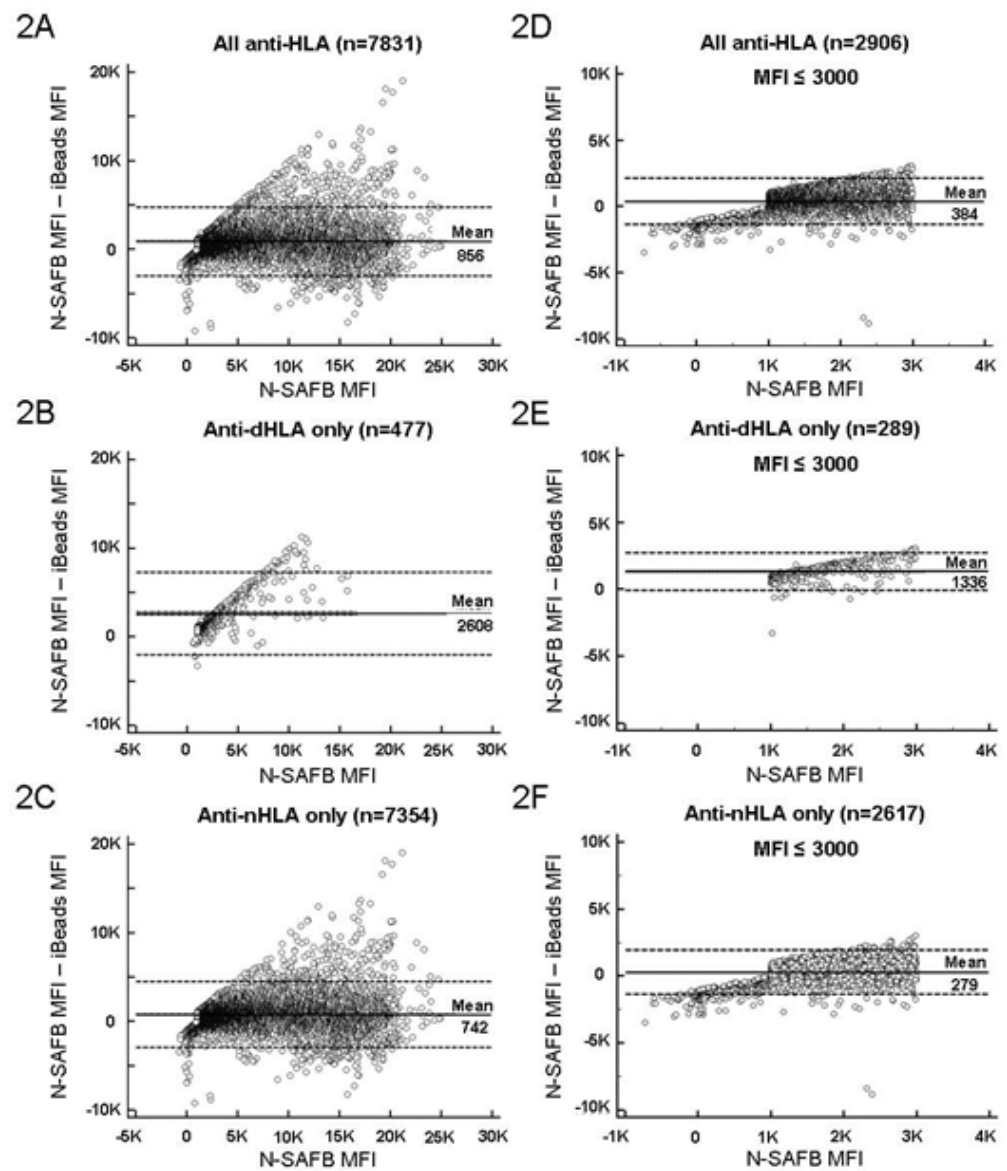
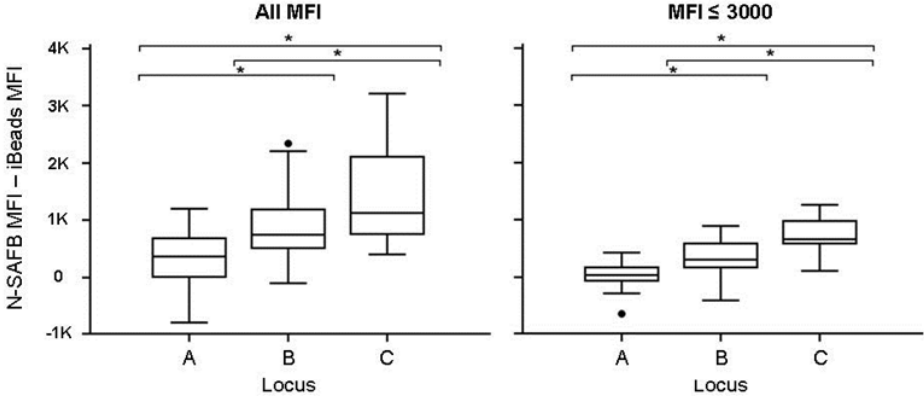
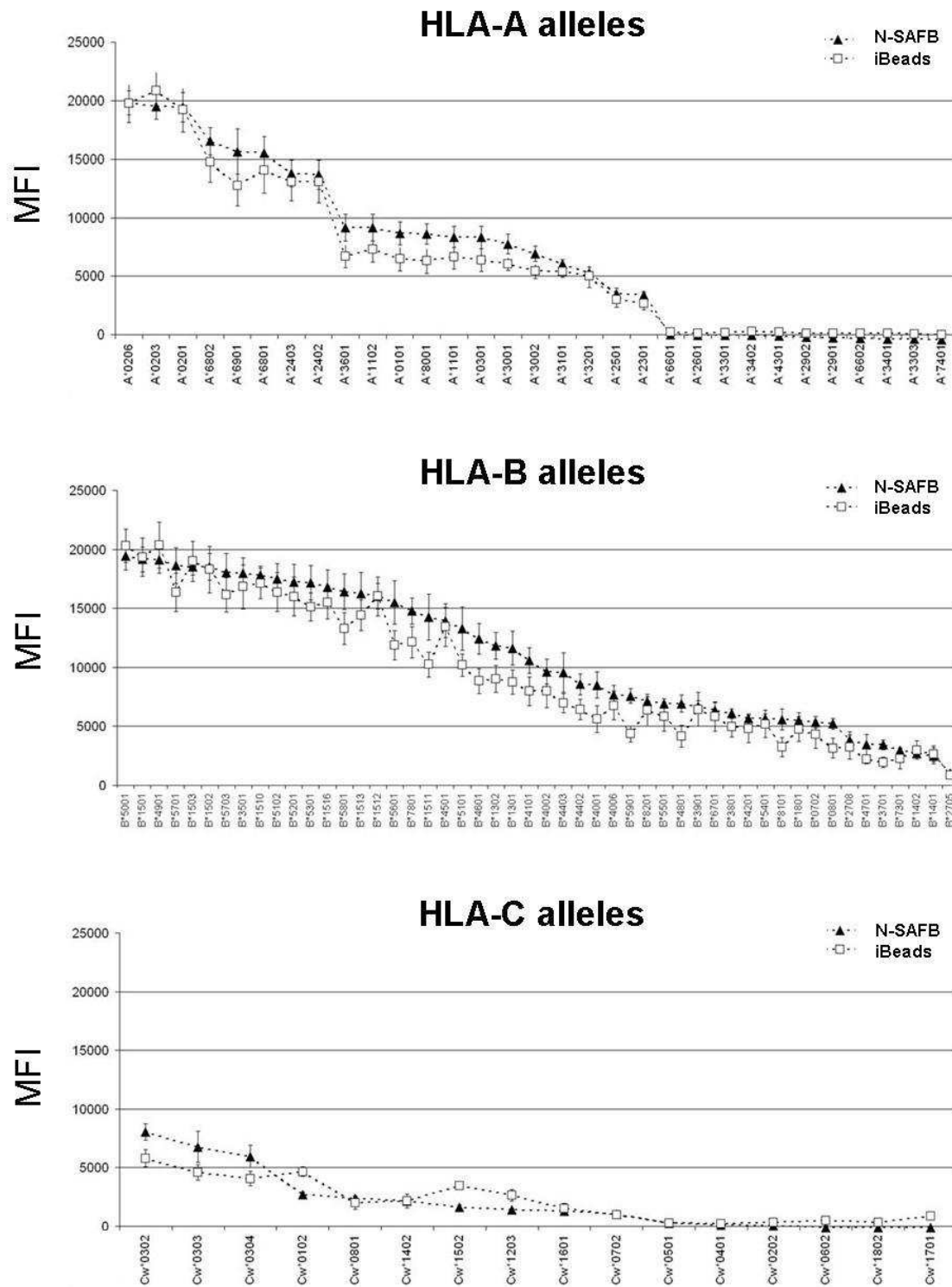


FIGURE 3

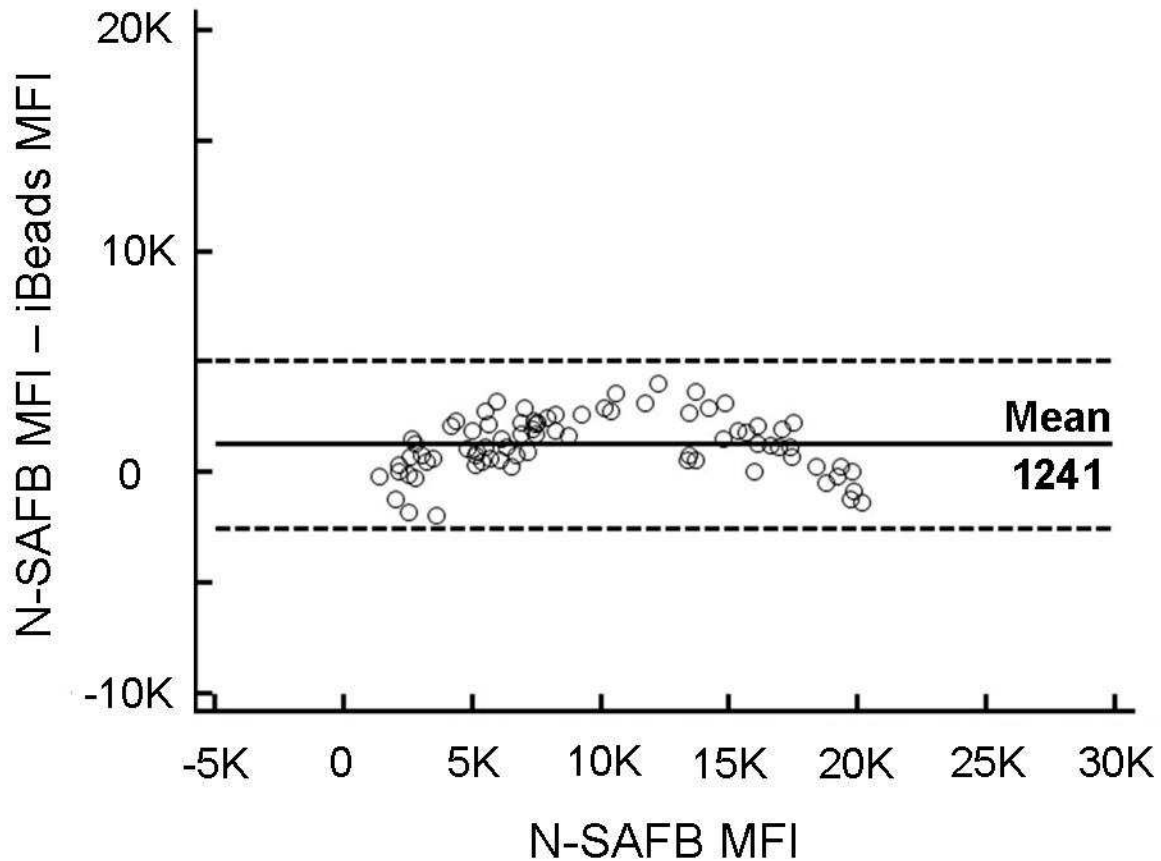


Supplemental digital content



SDC, Figure 1: Comparison of MFI values provided by SAFB and iBeads assays with the positive control serum. Mean values +/- standard deviation are represented for HLA-A (top panel), HLA-B (middle panel) and HLA-C (bottom panel) alleles, classified by MFI in descending order (n=6 experiments).

Control positive serum (n=6)



SDC, Figure 2: Comparison of MFI values provided by N-SAFB and iBeads assays with the positive control serum. Bland-Altman plot represents MFI difference between N-SAFB and iBeads assays through 6 different measures. Full line represents mean of difference and dashed lines ± 1.96 mean standard deviation.

SDC, Table 1. Allele-per-allele distribution of reactive HLA alleles positive with N-SAFB and/or iBeads, for locus A. Positive (MFI \geq 1000) HLA-A alleles with N-SAFB were categorized into anti-dHLA and anti-nHLA according to the D/N MFI ratio, and were subclassified according to their positivity/negativity towards iBeads. Some alleles were positive with iBeads only. Then mean MFI differences between N-SAFB and iBeads were calculated for all anti-nHLA and iBeads-positive alleles only, as well as for anti-nHLA with MFI not higher than 3000 with SAFB, or with iBeads when SAFB was negative.

Alleles	N-SAFB MFI \geq 1000 (n)	Anti- dHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-dHLA (n)	Anti- nHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-nHLA (n)	iBeads- positive only (n)	Anti-nHLA and iBeads- positive only (all)	Anti-nHLA and iBeads- positive only (MFI \leq 3000)		
							Number	Mean N- SAFB - iBeads MFI difference	Number	Mean N-SAFB - iBeads MFI difference
HLA-A	2430	152	68/84	2278	2100/178	144	2422	274	828	19
A*01:01	77	4	2/2	73	66/7	5	78	1200	18	159
A*02:01	69	1	0/1	68	61/7	6	74	935	24	91
A*02:03	71	1	0/1	70	62/8	3	73	505	23	108
A*02:06	70	2	0/2	68	63/5	5	73	711	22	-33
A*03:01	58	2	1/1	56	54/2	4	60	370	16	-26
A*11:01	63	3	1/2	60	57/3	6	66	27	21	-74
A*11:02	77	3	2/1	74	72/2	14	88	-345	36	-650
A*23:01	106	6	3/3	100	88/12	5	105	-73	34	181
A*24:02	107	4	2/2	103	101/2	7	110	-793	35	-281
A*24:03	107	5	2/3	102	97/5	7	109	-413	41	-215
A*25:01	114	11	5/6	103	95/8	6	109	-324	42	-51
A*26:01	77	15	6/9	62	57/5	4	66	458	17	172
A*29:01	72	2	1/1	70	62/8	2	72	124	24	251
A*29:02	70	2	1/1	68	61/7	3	71	388	23	164
A*30:01	56	3	1/2	53	46/7	3	56	734	23	34
A*30:02	53	2	1/1	51	47/4	2	53	723	20	22
A*31:01	61	4	3/1	57	56/1	4	61	4	25	-162
A*32:01	96	3	2/1	93	92/1	1	94	-85	32	-72
A*33:01	65	3	1/2	62	58/4	6	68	206	24	-65
A*33:03	71	1	1/0	70	67/3	3	73	360	28	38
A*34:01	78	10	6/4	68	65/3	8	76	99	27	-151
A*34:02	81	4	3/1	77	73/4	2	79	244	24	35
A*36:01	70	7	3/4	63	57/6	3	66	972	20	359
A*43:01	75	11	3/8	64	61/3	5	69	527	19	78
A*66:01	90	16	5/11	74	66/8	2	76	940	23	305
A*66:02	92	9	3/6	83	80/3	9	92	127	32	-293
A*68:01	79	2	1/1	77	69/8	4	81	485	24	336
A*68:02	97	3	1/2	94	75/19	4	98	624	38	429
A*69:01	80	2	0/2	78	67/11	5	83	1162	27	337
A*74:01	64	3	3/0	61	57/4	2	63	219	32	116
A*80:01	84	8	5/3	76	68/8	4	80	-78	34	36

SDC, Table 2. Allele-per-allele distribution of reactive HLA alleles positive with N-SAFB and/or iBeads, for locus B. Positive (MFI \geq 1000) HLA-B alleles with N-SAFB were categorized into anti-dHLA and anti-nHLA according to the D/N MFI ratio, and were subclassified according to their positivity/negativity towards iBeads. Some alleles were positive with iBeads only. Then mean MFI differences between N-SAFB and iBeads were calculated for all anti-nHLA and iBeads-positive alleles only, as well as for anti-nHLA with MFI not higher than 3000 with SAFB, or with iBeads when SAFB was negative.

Alleles	N-SAFB MFI \geq 1000 (n)	Anti- dHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-dHLA (n)	Anti- nHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-nHLA (n)	iBeads- positive only (n)	Anti-nHLA and iBeads- positive only (all)		Anti-nHLA and iBeads-positive only (MFI \leq 3000)	
							Number	Mean N- SAFB - iBeads MFI difference	Number	Mean N-SAFB - iBeads MFI difference
B	4339	228	31/197	4111	3597/514	115	4226	888	1499	328
B*07:02	85	5	2/3	80	76/4	1	81	733	21	335
B*08:01	89	16	1/15	73	51/22	5	78	1854	29	829
B*13:01	85	4	0/4	81	72/9	2	83	997	22	509
B*13:02	92	3	0/3	89	83/6	3	92	514	30	300
B*14:01	51	4	0/4	47	42/5	1	48	510	19	148
B*14:02	55	4	0/4	51	46/5	1	52	323	20	215
B*15:01	76	4	0/4	72	66/6	4	76	532	30	16
B*15:02	86	6	0/6	80	72/8	0	80	1071	28	582
B*15:03	76	7	1/6	69	66/3	1	70	407	32	159
B*15:10	78	3	0/3	75	69/6	0	75	942	26	491
B*15:11	68	5	0/5	63	48/15	4	67	1710	26	409
B*15:12	134	6	2/4	128	115/13	3	131	352	52	305
B*15:13	77	4	0/4	73	64/9	14	87	448	43	-358
B*15:16	100	5	0/5	95	79/16	8	103	613	47	-49
B*18:01	68	3	0/3	65	58/7	9	74	320	34	-262
B*27:05	95	3	0/3	92	86/6	0	92	485	26	164
B*27:08	90	5	0/5	85	78/7	1	86	685	27	223
B*35:01	78	2	0/2	76	71/5	0	76	690	21	194
B*37:01	99	9	3/6	90	64/26	2	92	1134	44	824
B*38:01	82	2	0/2	80	73/7	2	82	372	33	137
B*39:01	67	2	0/2	65	61/4	2	67	371	24	120
B*40:01	87	9	1/8	78	71/7	1	79	1459	20	491
B*40:02	83	2	0/2	81	78/3	0	81	479	19	308
B*40:06	80	2	0/2	78	70/8	4	82	609	26	266
B*41:01	91	7	0/7	84	70/14	1	85	1171	36	596
B*42:01	89	5	1/4	84	77/7	0	84	1168	30	571
B*44:02	98	15	1/14	83	74/9	10	93	877	34	-229
B*44:03	87	6	0/6	81	76/5	11	92	662	34	-412
B*45:01	111	9	4/5	102	100/2	10	112	197	37	12
B*46:01	72	3	2/1	69	49/20	0	69	1674	30	889
B*47:01	77	5	0/5	72	64/8	0	72	1527	19	633

SDC, Table 2 (continued).

Alleles	N-SAFB MFI ≥1000 (n)	Anti- dHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-dHLA (n)	Anti- nHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-nHLA (n)	iBeads- positive only (n)	Anti-nHLA and iBeads- positive only (all)		Anti-nHLA and iBeads- positive only (MFI ≤3000)	
							Number	Mean N- SAFB - iBeads MFI difference	Number	Mean N-SAFB - iBeads MFI difference
B*48:01	77	8	1/7	69	55/14	4	73	2208	23	444
B*49:01	111	2	1/1	109	102/7	1	110	-100	42	4
B*50:01	92	6	0/6	86	79/7	2	88	505	34	268
B*51:01	84	2	0/2	82	70/12	0	82	1240	25	277
B*51:02	100	1	0/1	99	86/13	1	100	584	34	288
B*52:01	91	3	0/3	88	78/10	0	88	659	34	242
B*53:01	88	0	0/0	88	81/7	0	88	750	30	339
B*54:01	83	3	2/1	80	69/11	2	82	668	34	236
B*55:01	87	3	2/1	84	83/1	0	84	1037	22	430
B*56:01	86	4	1/3	82	65/17	0	82	1554	29	483
B*57:01	101	0	0/0	101	82/19	0	101	1175	34	750
B*57:03	99	1	0/1	98	80/18	0	98	1192	32	728
B*58:01	86	2	0/2	84	72/12	2	86	1395	26	590
B*59:01	87	3	0/3	84	60/24	0	84	2047	30	823
B*67:01	103	3	1/2	100	75/25	1	101	758	42	658
B*73:01	82	2	0/2	80	62/18	1	81	1230	33	749
B*78:01	79	3	1/2	76	65/11	1	77	843	32	529
B*81:01	81	5	1/4	76	67/9	0	76	2344	14	892
B*82:01	116	12	3/9	104	97/7	0	104	601	30	203

SDC, Table 3. Allele-per-allele distribution of reactive HLA alleles positive with N-SAFB and/or iBeads, for locus C. Positive (MFI \geq 1000) HLA-C alleles with N-SAFB were categorized into anti-dHLA and anti-nHLA according to the D/N MFI ratio, and were subclassified according to their positivity/negativity towards iBeads. Some alleles were positive with iBeads only. Then mean MFI differences between N-SAFB and iBeads were calculated for all anti-nHLA and iBeads-positive alleles only, as well as for anti-nHLA with MFI not higher than 3000 with SAFB, or with iBeads when SAFB was negative.

Alleles	N-SAFB MFI ≥1000 (n)	Anti- dHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-dHLA (n)	Anti- nHLA (n)	iBeads- positive/negative anti-nHLA (n)	iBeads- positive only (n)	Anti-nHLA and iBeads- positive only (all)		Anti-nHLA and iBeads- positive only (MFI ≤3000)	
							Number	Mean N- SAFB - iBeads MFI difference	Number	Mean N- SAFB - iBeads MFI difference
C	784	89	10/79	695	509/186	19	714	1454	290	763
C*01:02	46	6	3/3	40	29/11	0	40	1047	16	595
C*02:02	65	8	0/8	57	42/15	0	57	2184	18	1137
C*03:02	43	3	1/2	40	33/7	3	43	906	18	617
C*03:03	46	3	1/2	43	31/12	2	45	1173	21	587
C*03:04	39	1	0/1	38	28/10	1	39	1075	17	665
C*04:01	38	3	0/3	35	26/9	0	35	2044	16	1264
C*05:01	60	9	0/9	51	31/20	1	52	2600	22	852
C*06:02	58	10	0/10	48	44/4	0	48	792	16	595
C*07:02	44	5	0/5	39	17/22	4	43	3215	21	1100
C*08:01	37	3	0/3	34	24/10	0	34	1167	13	753
C*12:03	43	6	1/5	37	30/7	1	38	715	16	514
C*14:02	33	5	1/4	28	23/5	1	29	732	9	434
C*15:02	68	9	2/7	59	50/9	0	59	535	23	640
C*16:01	32	6	0/6	26	21/5	4	30	397	16	104
C*17:01	79	7	1/6	72	46/26	1	73	1432	30	955
C*18:02	53	5	0/5	48	34/14	1	49	2425	18	995

VI-4 – Quatrième article : Impact clinique des anticorps anti-HLA dénaturé de classe I préformés et dirigés contre le donneur en transplantation rénale

Article publié dans la revue *Clinical Transplantation*

« Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation »

Jonathan Visentin, Mélanie Marroc, Gwendaline Guidicelli, Thomas Bachelet, Thoa Nong, Jean-François Moreau, Jar-How Lee, Pierre Merville, Lionel Couzi and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

Ce travail fait suite aux trois articles précédents et clôt la partie de ce mémoire consacrée aux anticorps anti-HLA dénaturés de classe I. Toutes nos analyses concernant la possible pathogénicité des anti-dHLA reposaient sur les résultats du XM CMF sur lymphocytes T. Il nous restait à analyser l'impact clinique réel des anti-dHLA préformés chez les patients transplantés, définis soit par le traitement acide des billes, soit par les iBeads[®].

Mon rôle dans cette étude a consisté en le recueil et l'analyse statistique des données biologiques et en la rédaction d'une partie de l'article. Les données cliniques ont été collectées par le Dr Mélanie Marroc, alors interne dans le service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, qui a été aidée par le Pr Lionel Couzi pour les analyses statistiques des données histologiques et de survie des greffons.

Parmi les 179 patients immunisés transplantés dans notre centre entre 2000 et 2008, 86 n'avaient pas de DSA préformés, 67 des DSA de classe I dont 44 sans DSA de classe II associé, et 26 n'avaient que des DSA de classe II (Figure 1, panel B). Les DSA de classe I avaient une MFI relativement faible, avec une médiane de 1729. En effet, 80% des patients qui les portaient avaient été greffés avec un XM négatif. Selon le test à l'acide et les iBeads[®], les anti-dHLA représentaient 11 et 18% des DSA de classe I, respectivement, et leur MFI sur billes SAG classiques non traitées était relativement faible (médiane de 767 et 628) (Table 2). Au final, seulement 7 patients avaient été transplantés avec des anti-dHLA DSA préformés sans anti-nHLA DSA associé en classe I, dont 2 avaient également au moins un DSA de classe II. Aucun de ces 7 patients n'a montré de rejet humoral durant la première année post-transplantation (Tables 4 et 7).

Title: Clinical Impact of Preformed Donor Specific Denatured Class I HLA Antibodies after Kidney Transplantation

Authors:

Jonathan VISENTIN^{1,2}, Mélanie MARROC³, Gwendaline GUIDICELLI¹, Thomas BACHELET², Thoa NONG⁴, Jean-François MOREAU^{1,2}, Jar-How LEE⁴, Pierre MERVILLE^{2,3}, Lionel COUZI^{2,3} and Jean-Luc TAUPIN^{1,2}.

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

²UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

³Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA

This work is attributed to Bordeaux University Hospital

Running Head: Denatured HLA Antibodies in Kidney Transplantation

Correspondence:

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel +33 5-57-82-08-84 / Fax +33 5-56-79-60-79

Email jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Conflict of interests

T.N. and J.L. are employees of One Lambda Inc. No specific funding was obtained for this study. The class I SAFB assays in acid-denatured condition for the patients with DSA in non-treated condition, and the iBeads assays were performed in One Lambda's research department as a scientific collaboration, with reagents and equipments provided by One Lambda Inc and by staff people employed by One Lambda Inc.

The other authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Abbreviations: AMR: antibody-mediated rejection, Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibody(ies), anti-IL2R: anti-IL2 receptor antibody, Anti-nHLA: anti-native HLA antibody(ies), ATG: anti-thymocyte globulin, CDCXM: complement-dependent cytotoxicity crossmatch, DCGS: death-censored graft survival, dHLA: denatured class I HLA, DSA: donor specific antibody(ies), FCXM: flow cytometry crossmatch, iBeads-: iBeads negative, iBeads+: iBeads positive, IVIG: intravenous immunoglobulins, MCS: mean channel shift, MFI: mean fluorescence intensity, nHLA: native class I HLA, SAFB: single antigen flow bead(s), TCMR: T-cell mediated rejection.

Visentin J, Marroc M, Guidicelli G, Bachelet T, Nong T, Moreau J-F, Lee J-H, Merville P, Couzi L and Taupin J-L. Clinical Impact of Preformed Donor Specific Denatured Class I HLA Antibodies after Kidney Transplantation. Clin Transplant.

Abstract

Class I single antigen flow beads (SAFB) carry native and denatured HLA molecules. Using a cohort of 179 class I HLA sensitised kidney recipients, we described incidence and clinical relevance of preformed denatured HLA Donor Specific Antibodies (DSA) using two different assays: an acid-treated SAFB assay (anti-dHLA DSA) and the iBeads assays (SAFB+/iBeads-DSA). Eighty-five class I DSA were found in 67 patients [median mean fluorescence intensity (MFI) of 1729 (range 520-13882)]. Anti-dHLA and SAFB+/iBeads- DSA represented 11% and 18% of class I DSA and were mainly low MFI DSA (500-1000 MFI). Concordance between these two assays was good (90%). None of the patients with only class I anti-dHLA DSA or only SAFB+/iBeads- DSA developed acute clinical AMR in the first year post-transplantation, and their 5-year DCGS was similar to that of patients without DSA. Moreover, all these patients displayed a negative current T-cell flow cytometry crossmatch. Therefore, both anti-dHLA DSA and SAFB+/iBeads- DSA appear irrelevant, which could explain the good outcome observed in some patients with preformed class I DSA.

Keywords: Antibody-Mediated Rejection, Denatured Class I HLA Antibodies, Donor Specific Antibodies, HLA, Kidney Transplantation.

Correspondence :

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Introduction

The single antigen flow bead (SAFB) assays on the Luminex[®] platform have considerably improved the identification of anti-HLA antibodies and donor specific antibodies (DSA) in transplant recipients. This simple and highly sensitive assay is now massively used in routine practice. Retrospective studies have shown that pre-transplant SAFB DSA are associated with a higher risk of graft loss and antibody-mediated rejection (AMR) (1-3), even for those with low mean fluorescence intensity (MFI) (2). A recent meta-analysis suggested that the presence of DSA detected by SAFB nearly doubled the risk for AMR and increased the risk for graft failure by 76%, despite a negative flow cytometry crossmatch (FCXM) (4). However, in these reports, not all SAFB-positive DSA were harmful, as many patients did not develop AMR. Accordingly, it has recently been observed that 5-year graft survival is higher in recipients with class I DSA, as detected with SAFB, compared to those with class II DSA, suggesting that non-deleterious or irrelevant DSA could be more frequently encountered among class I DSA (5).

The SAFB assay uses purified recombinant HLA molecules bound to polystyrene beads. It is known that not only native class I HLA (nHLA) but also denatured class I HLA (dHLA), i.e. free HLA class I heavy chain dissociated from beta 2-microglobulin and peptide, are simultaneously present on the class I SAFB surface, and that dHLA can be the target of serum antibodies (6). The concomitant use of SAFB and acid-treated SAFB has allowed distinguishing anti-native HLA antibodies (anti-nHLA) from anti-denatured HLA antibodies (anti-dHLA) (6-8). Indeed, acid treatment is known to dissociate the class I HLA heterotrimer (9-12), leaving the beads covered with dHLA only (6). By combining both SAFB and acid-treated SAFB assays, we recently proposed a threshold allowing accurately distinguishing anti-dHLA from anti-nHLA by comparison of MFI between non-treated and acid-treated conditions (8). More recently, a new SAFB reagent largely devoid of denatured class I HLA

antigens through enzymatic treatments (iBeads, One Lambda) has also been proposed as being insensitive to anti-dHLA antibodies (7, 8). In comparison with classical SAFB, iBeads have been shown in a clinical study to better distinguish pathogenic DSA (7) and we previously demonstrated that iBeads were more selective towards antibodies able to trigger FCXM positivity (8). Noteworthy, the several reports suggesting a lack of clinical relevance for anti-dHLA DSA, as defined with acid-treatment of classical SAFB or with iBeads, were only case reports or did not use SAFB assays but only screening assays, while others did not consider associated class II DSA which could constitute a confounding factor in the analysis (7, 13, 14).

The aim of this retrospective study was to evaluate the incidence and clinical relevance of SAFB-identified preformed class I DSA on the day of transplantation, according to their behaviour towards acid-treated SAFB and iBeads, and taking into account the presence or absence of class II DSA.

Patients and methods

Patients

The 179 class I HLA sensitized kidney recipients transplanted with a deceased donor between January 2000 and December 2008 at the Bordeaux University Hospital were included in this retrospective single-centre study and were followed until February 2013. Clinically indicated allograft biopsies were performed when creatininemia raised by more than 20% or when significant proteinuria occurred. All reported rejection episodes were biopsy-proven and defined according to the Banff 2009 classification (15), updated with the Banff 2013 report for AMR definition (16). Institutional review board approval has been obtained. The study was conducted in accordance with the 2000 Declaration of Helsinki and the Declaration of Istanbul 2008. Informed consent was obtained from every patient prior to their inclusion in the study. Induction therapy included for the most part anti-IL2 receptor antibody (anti-IL2R) (45%) or anti-thymocyte globulins (ATG) (52%), and intravenous immunoglobulins (IVIG) (15%) when crossmatch was positive. Maintenance therapy predominantly used tacrolimus (78%) or cyclosporine (17%) associated with mycophenolate mofetil (94%). Through target level for tacrolimus was 8-12 ng/ml for the first 3 months, then 5-10 ng/ml afterwards. Through target level for cyclosporine was 100-150 ng/ml for the first 3 months, then 100-125 ng/ml. All patients received mycophenolate mofetil (2 g/day), no mycophenolic acid monitoring being routinely performed. T-cell mediated rejection (TCMR) was treated with intravenous steroids (500 mg/day for 3 days). AMR was treated with intravenous steroids (500 mg/day for 4 days), plasmapheresis (8 sessions) and afterwards IVIG (1 g/kg per day for 2 days).

SAFB assays

Day of transplantation sera were analysed in this study. Sera were stored at -80°C. Those which had not been tested for routine purposes with flow bead assays (screening implemented in April 2005 and SAFB in May 2008) were tested retrospectively according to manufacturer's recommendations (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). Only samples positive with the routine screening assay (Labscreen[®] Mixed Class I and II, One Lambda Inc., Canoga Park, CA) were tested with SAFB class I (lot 007) and/or class II (lot 009) assays. Measured MFI values were normalized using the baseline formula (Fusion[®] software, One Lambda Inc.) Our local post-transplant positivity threshold of $\text{MFI} \geq 500$ was applied for DSA definition. Two different approaches were used to differentiate anti-nHLA from anti-dHLA antibodies. On the one hand, denaturation of classical class I SAFB was performed by pre-incubating the beads for 30 min with 0.1 M glycine buffer containing 1% bovine serum albumin (pH=2.5), followed by three washes with the SAFB kit washing buffer. The assay was then performed exactly as for the non-denaturing condition. Consistency of denaturation was ascertained with a positive control serum containing only anti-nHLA, as previously reported (8). On the second hand, the iBeads kit (lot 001, One Lambda Inc.) was used for sera still available at the time of the study (59 among 67 sera, i.e. 88%). The same threshold as for classical SAFB ($\text{MFI} \geq 500$) was applied for positivity definition.

Characterization of class I DSA with acid-treatment

The maximum variation coefficient of inter-assay variability observed in our laboratory is about 20% for normalized MFI values above 500 (data not shown). Hence, we considered as significant a MFI increase after acid-induced denaturation (D) of ≥ 1.2 times the non-treated (N) condition MFI and therefore classified beads into two categories according to MFI ratio between the denaturing (D) and non-treated (N) conditions. Those with a noticeable

increase in reactivity after acid treatment ($D \geq 1.2N$) were considered as recognized by anti-dHLA and the remaining were considered as recognized by anti-nHLA.

Crossmatches

The complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM) and the FCXM assays were performed prospectively, as previously reported (17). For this study, only the crossmatch results for the day of the transplant serum were considered. The positivity threshold for CDCXM was set at 20% of dead cells. The locally-defined positivity thresholds for T-lymphocyte FCXM and B-lymphocyte FCXM were at mean channel shift (MCS) values of 50 and 70 above the negative control, respectively. The negative control was a serum pool from AB group non allosensitised donors.

Statistical analysis

Comparisons between the groups were performed using conventional statistics for matched data: Mc Nemar χ^2 or Fisher's exact test for qualitative variables, Student's t-test or Wilcoxon rank-test for quantitative variables, when appropriate. Graft survival was analyzed with the Kaplan–Meier method, and group differences were assessed by the log-rank test. The variables potentially associated with the occurrence of AMR were subjected to univariate analysis. Risk factors with a p-value lower than 0.05 were included in a multivariate model. Analyses were performed with JMP.10 (version 2012, SAS Institute Inc, Cary, NC).

Results

Characteristics of the patients' cohort and DSA

The 179 class I HLA sensitized kidney recipients transplanted in our centre between January 2000 and December 2008 were included. The characteristics of the cohort are depicted in Table 1. All the patients were transplanted with a negative current T-cell CDCXM while 8 (4.6%) were transplanted with a positive current B-cell CDCXM. Twenty-five (14%) were transplanted with a current positive T-cell FCXM and 36 (20%) with a current positive B-cell FCXM. Sera harvested the day of transplantation were tested with the class I and/or II SAFB when the flow bead screening assay was positive. Eighty-five class I SAFB DSA were found in 67 patients as 52 patients had only 1 class I DSA, 12 patients had 2 class I DSA and 3 patients had 3 class I DSA. They were directed against 36 HLA-A (42%), 32 HLA-B (38%), and 17 HLA-Cw (20%), with a median MFI of 1729 (range 520-13882). Moreover, 49 patients had class II DSA (DR and/or DQ and/or DP DSA), 23 having both class I + II DSA and 26 having only class II DSA, then 44 patients had only class I DSA and 86 patients had no DSA. Patients with no DSA received more frequently induction treatment with anti-IL2R than DSA groups which mainly received ATG ($p=0.04$). No other difference in treatment was found between patients with and without preformed DSA.

Description of denatured and native class I HLA DSA

Using concomitantly non-treated and acid-treated SAFB (see Materials and Methods), a total of 9 anti-dHLA (11%) and 76 anti-nHLA DSA (89%) were found among the 85 DSA (Table 2 and Figure 1A). Eight percent of HLA-A, 3% of HLA-B, and 29% of HLA-Cw DSA were found to be anti-dHLA DSA. Median (range) anti-dHLA and anti-nHLA DSA MFI in non-treated condition was 767 (520-9078) and 2088 (529-13882), respectively ($p=0.01$). Anti-

dHLA DSA were found in 21%, 6% and 4% of class I DSA with a MFI in the 500-999, 1000-2999 and ≥ 3000 range, respectively.

Seventy-four among the 85 non-treated SAFB+ class I DSA could be analyzed with iBeads. Fifty-nine (88%) among the 67 anti-nHLA DSA tested were iBeads positive (iBeads+, MFI ≥ 500) whereas 5 (71%) among the 7 anti-dHLA DSA tested were iBeads negative (iBeads-, MFI < 500). Of note, Anti-nHLA and iBeads+ DSA were more frequently encountered among patients who have had a previous transplant ($p=0.004$ and 0.001 for anti-nHLA and iBeads+ DSA, respectively).

Description of iBeads+ and iBeads- class I HLA DSA

Among the 74 SAFB+ class I DSA analysed with iBeads, 13 (18%) were iBeads- and 61 (82%) were iBeads+ (Table 2 and Figure 1A). SAFB+/iBeads- DSA represented 19% of HLA-A, 14% of HLA-B and 20% of HLA-Cw DSA. Median (range) non-treated SAFB+ MFI was 628 (529-1690) and 2713 (601-13882) for the iBeads- and iBeads+ DSA, respectively ($p=0.0001$). The iBeads- DSA were found in 55%, 7% and 0% of the non-treated SAFB class I DSA with MFI in the 500-999, 1000-2999 and ≥ 3000 range, respectively. Only 38% of non-treated SAFB+/iBeads- DSA were anti-dHLA, whereas 97% of non-treated SAFB+/iBeads+ DSA were anti-nHLA.

Distribution of denatured and native class I HLA DSA in patients

Seven recipients only had anti-dHLA class I DSA, all having only 1 DSA. The remaining 60 class I DSA-positive patients had at least one anti-nHLA DSA (Figure 1B and Table 3). DSA MFI sum with non-treated SAFB was lower in patients with anti-dHLA (median 999, range 519-9078) than in patients with anti-nHLA DSA (median 2859, range 529-26727, $p=0.02$). None of the 7 patients with anti-dHLA DSA and 28% (17/60) of patients with anti-nHLA DSA had a positive T-cell FCXM ($p=0.1$).

Distribution of iBeads+ and iBeads- class I HLA DSA in patients

The 74 non-treated SAFB DSA analysed with iBeads came from 59 patients. Among them, 7 only had iBeads- DSA and 52 had at least one iBeads+ DSA (Figure 1B and Table 3). Ninety-three percent of patients with anti-nHLA DSA were positive with iBeads (50/54), while 60% of patients with only anti-dHLA DSA were negative with iBeads (3/5). Then, non concordance between the two assays was observed in 10% of patients: 3% of anti-dHLA/iBeads+ patients and 7% of anti-nHLA/iBeads- patients. DSA MFI sum with non-treated SAFB was lower for patients with iBeads- DSA only (median 701, range 529-1690) than for patients with iBeads+ DSA (median 3146, range 643-26727) ($p=0.0002$). None of the patients with non-treated SAFB+/iBeads- DSA and 31% of patients with non-treated SAFB+/iBeads+ DSA had a positive T-cell FCXM ($p=0.08$).

Clinical impact of denatured and native class I HLA DSA

Patients displaying one-year AMR were 1 (2%) among the 44 patients with only class I DSA, 5 (22%) among the 23 patients with class I+II DSA, 4 (15%) among the 26 patients with only class II DSA and 5 (6%) among the 86 patients without preformed DSA ($p=0.02$) (Table 4). Timing, histological and serological characteristics of these patients are described in Table 5. Among the 5 patients who displayed one-year AMR, only one had *de novo* DSA and then was classified as an acute/active AMR, the four others being considered as “suspicious” for acute/active AMR. T-cell mediated rejection incidence and 5-year death-censored graft survival (DCGS) were similar in these 4 groups. Using multivariate analysis including seven parameters (recipient age, donor age, extended criteria donor (18), ischemia time, delayed graft function, class I DSA, class II DSA), we observed that only class II DSA were independently associated with an increased risk of AMR (OR 5.02, $p=0.01$, Table 6).

Among the 44 patients with only class I DSA, 5 had only anti-dHLA and 39 had anti-nHLA. Both AMR incidence and 5-year DCGS were similar in these 2 groups (Table 4). Among the 23 patients with both class I+II DSA, 2 had anti-dHLA and 21 had anti-nHLA class I DSA. No AMR was observed for the 2 patients with anti-dHLA, versus 5 (24%) among the 21 patients with anti-nHLA DSA ($p=0.4$). Five-year DCGS was 100% (2/2) and 76% (16/21) in anti-dHLA and anti-nHLA class I DSA patients, respectively ($p=0.4$).

There was no significant difference in non-treated SAFB MFI sum between patients having anti-nHLA whichever they underwent 1-year AMR or not [median (range) no AMR: 2942 (644-14511), AMR: 5164 (2013-26728), $p=0.09$]. No difference in maintenance treatment was found between the patients categories depicted in Table 4 (data not shown).

Clinical impact of iBeads+ and iBeads- class I HLA DSA

No AMR were observed and 5-year DCGS was 100% in patients with SAFB+/iBeads- DSA. AMR incidence and 5-year DCGS were similar between SAFB+/iBeads- and SAFB+/iBeads+ patients, whether or not class II DSA were associated (Table 7). Regarding SAFB+/iBeads+ patients with class II DSA, we did not observe a significant difference on iBeads MFI sum between those who displayed 1-year AMR and those who did not [median (range) no AMR: 2149 (700-14693), AMR: 5524 (542-23798), $p=0.22$]. No difference in maintenance treatment was found between the patients categories depicted in Table 6 (data not shown).

Discussion

Clinical relevance of preformed class I DSA detected with SAFB only is still a debate, especially for those with low MFI (2, 4, 5), and this question has become more complex when it was discovered that class I SAFB assay can identify anti-dHLA DSA (6). Previous studies describing clinical relevance of anti-dHLA DSA have concluded that these antibodies could be non-deleterious (7, 14). We designed this study to reappraise this hypothesis, by using SAFB assays and integrating the presence or absence of class II DSA in the analysis. Considering this parameter is crucial, especially as we identified it as the sole criterion associated with higher risk of AMR by multivariate analysis.

In our cohort, none of the patients with only class I anti-dHLA DSA or only SAFB+/iBeads- DSA developed acute clinical AMR in the first year post-transplantation, and their 5-year DCGS was similar to that of patients without DSA. Moreover, these patients all displayed a negative current T-cell FCXM, whereas T cell FCXM positive patients had a higher incidence of 1 year AMR (data not shown). This was in accordance with our previous report demonstrating that anti-dHLA yield positive FCXM drastically less frequently than anti-nHLA (8). However, in the present study, the fact that the majority of anti-dHLA were of lower MFI than anti-nHLA could also explain this result, even if one patient had an anti-dHLA DSA with a MFI above 9000.

Our findings suggested that anti-dHLA DSA and SAFB+/iBeads- DSA could be non-detrimental to the transplant, although we were unable to draw definitive conclusions regarding the clinical impact of anti-dHLA or SAFB+/iBeads- DSA, because patients with class I anti-nHLA or SAFB+/iBeads+ DSA also had a good outcome. This could be explained by the presence of a negative FCXM the day of transplantation for most of them, in line with the low median MFI for the anti-nHLA and SAFB+/iBeads+ DSA displayed in this cohort. However, among patients having anti-nHLA or iBeads+ DSA, we did not observe a

significant difference of DSA MFI sum between those who displayed 1-year AMR and those who did not. Moreover, our analysis lacked statistical power due to the weak number of patients having anti-dHLA DSA. Such a small number can be explained by the facts that, 1) although 39% of sensitized recipients awaiting a kidney transplant patients display anti-dHLA, they only represent 6% of class I anti-HLA antibodies (8) and as a consequence it is quite rare to transplant patients with preformed anti-dHLA DSA, and 2) both anti-nHLA and anti-dHLA antibodies are indistinctly inputed into our kidney national allocation program in order to perform transplantation without preformed DSA. However, as we previously described the negative impact of anti-dHLA on access to a transplant (8), a larger multicenter study would allow corroborating our findings and those already published, in order to establish whether or not the tracking of the anti-dHLA DSA with acid-treatment assay or iBeads is beneficiary to the patients.

In the present study, anti-dHLA DSA and SAFB+/iBeads- DSA represented 11% and 18% of preformed class I DSA, respectively. Interestingly we did not observe a strict concordance between these two assays, 10% of the patients being differently classified. This number appeared quite low and was in accordance with our previous work, showing 88% of concordance between both assays. On the one hand, the anti-dHLA/iBeads+ DSA could be explained by the fact that enzymatic treatments of iBeads might not remove all dHLA molecules from bead surface. Indeed, whereas iBeads were described as being largely devoid of denatured HLA molecules, staining with the HC-10 monoclonal antibody specific for a majority of class I FHC displays some residual binding (7). Alternatively, some sera could contain both anti-dHLA and anti-nHLA targeting the same donor antigen, and if so, the loss of anti-nHLA reactivity after acid-treatment could be masked by the increase of the anti-dHLA MFI. Experiments are underway to confirm this hypothesis. On the other hand, the anti-nHLA/iBeads- DSA could be explained by a slightly lower sensitivity of the iBeads when compared to the classical SAFB assay, as reported elsewhere (7). Then, each of these

two assays seemed to have its own limitations, but combining them with a sensitive prospective pre-transplant FCXM can compensate these impediments.

No AMR episodes were observed for patients with anti-dHLA/iBeads+ DSA and anti-nHLA/iBeads- DSA. Since the association between low titer DSA and poor outcome is still debated, SAFB acid-treatment and iBeads assays could be useful for patients with low MFI DSA. They could also represent valuable alternatives for patients with concomitant class II DSA, as in this category 24% of patients with anti-nHLA DSA and 26% of patients with SAFB+/iBeads+ DSA developed AMR versus none of the patients with anti-dHLA DSA or SAFB+/iBeads- DSA.

Our data showed that 29% of HLA-Cw DSA were anti-dHLA DSA. The recent literature demonstrates that anti-HLA-Cw antibodies can also cause AMR and graft failure, but their role remains unclear, and HLA-Cw matching is not considered in organ allocation in many countries, including France (19-23). Being more frequently found than anti HLA-A or -B, this could explain why it has not been possible so far to establish a consensus on the relevance of HLA-Cw DSA with a poor outcome.

In conclusion, our findings implement the knowledge in the field of preformed class I DSA, showing that anti-dHLA are usually of a lower MFI than anti-nHLA and appear clinically irrelevant, which can explain why some patients with low titer preformed class I DSA with the current routine SAFB assay have a very good outcome. In the routine setting of the pre transplant follow-up for class I sensitised patients, the acid-treatment assay could be used for the first available serum to identify anti-dHLA. Afterwards, only sera displaying new antibody specificities with the classical SAFB assay should be tested. An alternative could be to use the iBeads assay alone. Both strategies associated with a sensitive prospective emergency pre-transplant FCXM will help stratifying immunological risk for patients with class I DSA and performing transplantation with non-pathogenic anti-dHLA.

Acknowledgments

We acknowledge Catherine Rio, transplant coordinator nurse, for her valued assistance. We are grateful to the technicians of the immunology laboratory, for their technical expertise.

Author contributions

P.M., L.C. and J.T.: study design. J.V., M.M., G.G., T.B., T.N., J.L., L.C. and J.T.: performance of the research. J.V., M.M., L.C. and J.T.: data analysis. J.V., L.C. and J.T.: writing of the article. G.G., P.M. and J.M.: critical revision of the manuscript.

L.C. and J.T. contributed equally to this work.

References

1. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011; 11: 2132.
2. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1398.
3. Gloor JM, Winters JL, Cornell LD, et al. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2010; 10: 582.
4. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 2061.
5. Bentall A, Cornell LD, Gloor JM, et al. Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant*. 2013; 13: 76.
6. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol*. 2009; 70: 844.
7. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2013; 173: 536.
8. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, et al. Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation. *Transplantation*. 2014; 98: 738.
9. Polakova K, Karpatova M, Russ G. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol*. 1993; 30: 1223.

10. Perosa F, Luccarelli G, Prete M, Favoino E, Ferrone S, Dammacco F. Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. *J Immunol.* 2003; 171: 1918.
11. Sumitran-Karuppan S, Moller E. Acid treatment of lymphocytes selectively decreases the expression of HLA class I antigens: a method to confirm that a positive clinical crossmatch test was due to class I antibodies. *Transpl Immunol.* 1996; 4: 163.
12. Danliczyk UG, Delovitch TL. Beta 2-microglobulin induces a conformational change in an MHC class I H chain that occurs intracellularly and is maintained at the cell surface. *J Immunol.* 1994; 153: 3533.
13. Pereira S, Perkins S, Lee JH, et al. Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol.* 2011; 72: 492.
14. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schonemann C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation.* 2009; 88: 226.
15. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant.* 2010; 10: 464.
16. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014; 14: 272.
17. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation.* 2011; 91: 527.
18. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2003; 3 Suppl 4: 114.
19. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2011; 11: 1543.

20. Rogers NM, Bennett GD, Toby Coates P. Transplant glomerulopathy and rapid allograft loss in the presence of HLA-Cw7 antibodies. *Transpl Int*. 2012; 25: e38.
21. Duquesnoy RJ, Marrari M. Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transpl Immunol*. 2011; 24: 164.
22. Ling M, Marfo K, Masiakos P, et al. Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients. *Hum Immunol*. 2012; 73: 879.
23. Aubert O, Bories MC, Suberbielle C, et al. Risk of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with anti-HLA-C donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2014; 14: 1439.

Table 1: Patient characteristics

		Characteristics
		Mean \pm SD, or n (%)
Age (years)		46.7 \pm 11.8
Sex (M/F)		84 (47%) / 95 (53%)
Nephropathy		
	Glomerular	73
	Tubulo-interstitial	26
	Vascular	12
	Hereditary/congenital	39
	Others	3
	Unknown	26
Previous transplant (%)		95 (53%)
Transfusion (%)		97 (54%)
Pregnancy (%)		62 (35%)
Extended criteria donor (%)		34 (19%)
A-B-DR mismatches		2.8 \pm 1.4
Total ischemia (hours)		21 \pm 8
ATG^a/anti-IL2R antibodies/no (%)		93 (52%) / 80 (45%) / 6 (3%)
Intravenous Immunoglobulins (%)		26 (15%)
Tacrolimus/Ciclosporine/other (%)		140 (78%) / 30 (17%) / 9 (5%)
Mycophenolate mofetil (%)		169 (94%)
Delayed graft function (%)		74 (41%)

^aATG: anti-thymocyte globulins

Table 2: Description of class I HLA DSA. Class I DSA were identified with classical SAFB and then classified according to acid-treatment and iBeads assays. Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibodies; anti-nHLA: anti-native HLA antibodies; DSA: Donor Specific Antibodies; MFI: Mean fluorescence intensity; SAFB: Single antigen flow beads.

	SAFB DSA (n=85)		p	SAFB DSA tested with iBeads (n=74)		p
	Anti-dHLA DSA (n=9, 11%)	Anti-nHLA DSA (n=76, 89%)		iBeads - (n=13, 18%)	iBeads + (n=61, 82%)	
HLA-A DSA, n (%)	3 (33%)	33 (43%)		6 (46%)	25 (41%)	
HLA-B DSA, n (%)	1 (11%)	31 (41%)		4 (31%)	24 (39%)	
HLA-Cw DSA, n (%)	5 (56%)	12 (16%)		3 (23%)	12 (20%)	
Non-treated SAFB Median (range) MFI	767 (520-9078)	2088 (529-13882)	0.01	628 (529-1690)	2713 (601-13882)	0.0001
500≤MFI≤999, n (%)	6 (67%)	22 (29%)		11 (85%)	9 (15%)	
1000≤MFI≤2999, n (%)	2 (22%)	30 (39%)		2 (15%)	27 (44%)	
MFI≥3000, n (%)	1 (11%)	24 (32%)		0 (0%)	25 (41%)	
iBeads tested	n=7	n=67				
iBeads						
Median (range) MFI	338 (1-2272)	1842 (200-14374)	0.003			
iBeads +, n (%)	2 (29%)	59 (88%)				
iBeads -, n (%)	5 (71%)	8 (12%)				
iBeads not tested, n	2	9				

Table 3: Distribution of class I HLA DSA in patients. Class I DSA were identified with classical SAFB and then classified according to acid-treatment and iBeads assays. Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibodies; anti-nHLA: anti-native HLA antibodies; DSA: Donor Specific Antibodies; FCXM: Flow-cytometry crossmatch; MCS: Mean channel shift; MFI: Mean fluorescence intensity; SAFB: Single antigen flow beads.

	Patients with only anti-dHLA DSA (n=7)	Patients with anti-nHLA DSA (n=60)	P	Patients with only iBeads– DSA (n=7)	Patients with iBeads+ DSA (n=52)	P
Non-treated SAFB						
Median (range) MFI sum	999 (519-9078)	2859 (529-26727)	0.02	701 (529-1690)	3146 (643-26727)	0.0002
T-cell FCXM						
Median (range) MCS	5 (0-22)	13 (0-225)	0.2	0 (0-9)	17 (0-225)	0.0009
Positive T-cell FCXM						
(MCS ≥ 50), n (%)	0 (0%)	17 (28%)	0.1	0 (0%)	16 (31%)	0.08

Table 4: Outcome of patients according to acid-treatment assay. Class I DSA were identified with classical SAFB and then classified according to acid-treatment assay. AMR: Antibody mediated rejection; Anti-dHLA: anti-denatured HLA antibodies; anti-nHLA: anti-native HLA antibodies; DCGS: Death-censored graft survival; DSA: Donor Specific Antibodies; MFI: Mean fluorescence intensity; SAFB: Single antigen flow beads; TCMR: T cell mediated rejection.

179 patients						
	Class I HLA DSA n=44			Class I+II HLA DSA n=23	Class II HLA DSA n=26	No HLA DSA n=86
						p
1-year AMR	1 (2%)			5 (22%)	4 (15%)	5 (6%)
1-year TCMR	4 (9%)			2 (9%)	4 (15%)	10 (12%)
5-year patient survival	42 (95%)			21 (91%)	24 (92%)	82 (95%)
5-year graft survival	35 (80%)			17 (74%)	21 (81%)	71 (83%)
5-year DCGS ^c	37 (84%)			18 (78%)	23 (88%)	74 (86%)
	Anti-dHLA only n=5	Anti-nHLA n=39	p	Anti-dHLA only n=2	Anti-nHLA n=21	p
1-year AMR	0 (0%)	1 (3%)	0.7	0 (0%)	5 (24%)	0.4
1-year TCMR	0 (0%)	4 (10%)	0.5	0 (0%)	2 (10%)	0.6
5-year patient survival	5 (100%)	37 (95%)	0.6	1 (50%)	21 (100%)	0.004
5-year graft survival	4 (80%)	31 (79%)	0.7	1 (50%)	16 (76%)	0.7
5-year DCGS	4 (80%)	33 (85%)	0.8	2 (100%)	16 (76%)	0.4

Table 5: Timing, serological and histological characteristics of the patients who displayed 1-year antibody-mediated rejection. Clinically indicated allograft biopsies were performed and rejection episodes were defined according to the Banff 2013 classification and SAFB testing. AMR: Antibody mediated rejection; DSA: Donor Specific Antibodies; MFI: Mean fluorescence intensity; SAFB: Single antigen flow beads; TCMR: T cell mediated rejection.

Patient number	Time to rejection (days)	Day of transplantation DSA (MFI)	Day of biopsy DSA (MFI)	Histology												Banff diagnosis
				g	ptc	v	t	i	cg	cv	ct	ci	ah	mm	C4d	
#1	21	Cw6 (5400)	Cw6 (3127)	2	2	0	1	1	0	1	0	0	0	1	+	Acute/Active AMR
#2	36	Cw6 (13625), Cw17 (13103), DP2 (1506), DPB1*04:02 (1837)	Cw6 (14514), Cw17 (16068), DP2 (5733), DPB1*04:02 (1876)	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	+	Acute/Active AMR
#3	8	B18 (5164), DP11 (700)	B18 (1831), DP11 (678)	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	Acute/Active AMR
#4	14	A1 (767), B13 (784), Cw16 (2811), DPB1*04:01 (913)	A1 (9005), B13 (8765), Cw16 (8980), DPB1*04:01 (9988)	2	1	3	0	1	0	0	1	1	1	0	+	Acute/Active AMR
#5	20	Cw5 (2013), DQ7 (2212)	Cw5 (15844), DQ7 (21305)	1	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	+	Acute/Active AMR
#6	24	A68 (10685), DP3 (17787)	A68 (12709), DP3 (16035)	2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	+	Acute/Active AMR
#7	193	DQ6 (7787)	DR51 (1020), DQ6 (7300)	2	0	0	0	0	2	2	2	2	0	2	-	Chronic/Active AMR
#8	25	DP14 (2819)	DP14 (882)	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	+	Acute/Active AMR
#9	91	DP14 (1255)	DP14 (8851)	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	+	Acute/Active AMR
#10	67	DR4 (3339)	DR4 (700)	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	-	Acute/Active AMR
#11	292	No DSA	B38 (518), Cw12 (622), DR13 (763), DR52 (2545), DQ6 (1865), DQ7 (504)	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	+	Acute/Active AMR
#12	28	No DSA	No DSA	1	1	0	2	2	0	0	1	1	0	0	-	Suspicious for Acute/Active AMR + TCMR
#13	73	No DSA	No DSA	0	1	3	0	0	0	0	1	1	0	2	+	Suspicious for Acute/Active AMR
#14	18	No DSA	No DSA	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	+	Suspicious for Acute/Active AMR
#15	87	No DSA	No DSA	0	1	1	2	2	0	0	1	1	0	0	+	Suspicious for Acute/Active AMR + TCMR

Table 6: Multivariate analysis of factors associated with 1-year AMR. Extended criteria donor were defined as previously described (18). Ischemia time: time between the recovering of the kidney (no flow in the renal artery) and the anastomosis in the recipient. Delayed graft function was defined as the need of dialysis during the first week of transplantation. AMR: Antibody mediated rejection; DSA: Donor specific antibodies.

	Odd ratio	p
Recipient age	0.96	0.2
Donor age	1.01	0.6
Extended Criteria Donor	2.42	0.4
Ischemia time	1.03	0.4
Delayed graft function	0.57	0.4
Class I DSA	0.90	0.9
Class II DSA	5.02	0.01

Table 7: Outcome of patients according to iBeads assay. Class I DSA were identified with classical SAFB and then classified according to iBeads. AMR: Antibody mediated rejection; DCGS: Death-censored graft survival; DSA: Donor Specific Antibodies; MFI: Mean fluorescence intensity; SAFB: Single antigen flow beads; TCMR: T cell mediated rejection.

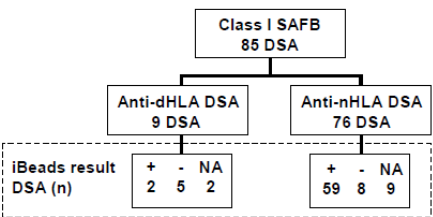
	Class I DSA n=38			Class I+II DSA n=21		
	SAFB+/iBeads- n=5	SAFB+/iBeads+ DSA n=33	p	SAFB+/iBeads- DSA n=2	SAFB+/iBeads+ DSA n=19	p
1-year AMR	0 (0%)	1 (3%)	0.6	0 (0%)	5 (26%)	0.4
1-year TCMR	0 (0%)	3 (9%)	0.7	0 (0%)	2 (11%)	0.6
5-year patient survival	5 (100%)	31 (94%)	0.6	1 (50%)	19 (100%)	0.008
5-year graft survival	5 (100%)	26 (79%)	0.2	1 (50%)	14 (74%)	0.7
5-year DCGS	5 (100%)	28 (85%)	0.3	2 (100%)	14 (74%)	0.4

Figures legends

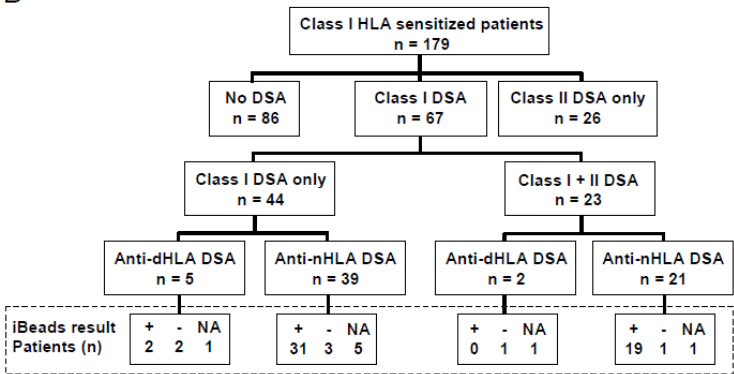
Figure 1: Distribution of DSA and patients according to acid-treatment and iBeads assays. Figure 1A: Class I DSA were classified as anti-nHLA and anti-dHLA according to acid-treatment assay, and then sub-categorized according to iBeads assay results. Figure 1B: Class I and II DSA distribution among the patients, according to acid-treatment and iBeads assays. +: positive; -: negative; NA: not available.

FIGURE 1

1A



1B



VI-5 – Anticorps anti-HLA dénaturé de classe I - Discussion des résultats

Notre premier article constitue la plus importante étude montrant la relation entre les résultats du traitement acide des billes SAG classe I, du XM CMF et des iBeads[®] chez des patients en attente de transplantation rénale, ainsi que l'impact des anti-dHLA sur l'accès à la greffe. A ce titre il a fait l'objet d'un commentaire éditorial dans le même numéro du journal (371).

Pour la première fois le seuil utilisé pour définir les anti-dHLA ($D \geq 1,2N$) était basé sur la fidélité intermédiaire de la technique, et n'était pas un seuil de MFI arbitraire ne tenant pas compte de la réactivité sur les billes non traitées. Notre estimation était, en partant d'un coefficient de variation intra-laboratoire maximum de 20% (et qui est de 13% en moyenne au sein de notre laboratoire), que nous avions moins de 16% de chance de nous tromper lors de l'assignation d'un anti-dHLA. Ceci a été confirmé par les résultats obtenus en XM CMF et, de manière intéressante, plus de 69% des anti-dHLA décrits dans notre étude possédaient un ratio D/N largement supérieur à 1,2N. A noter que les performances des seuils D/N et de MFI des iBeads[®] que nous avons utilisés étaient acceptables pour prédire un XM CMF négatif (sensibilité et -LR) mais pas un XM CMF positif (spécificité et +LR). Ce fut une volonté de notre part que de privilégier la sécurité des patients.

Les anti-nHLA à comportement intermédiaire constituaient une classe d'anticorps énigmatique, mais le fait qu'ils engendraient un crossmatch positif dans la majorité des cas indiquait leur réelle capacité à reconnaître des épitopes portés par les molécules HLA natives. A noter que le seuil $D \leq 0,2N$ utilisé pour définir les anti-nHLA « prototypiques », reconnaissant des épitopes sensibles à l'acide, était quant à lui arbitraire, car nous imaginions que ces anticorps devaient perdre la totalité de leur réactivité après traitement. En effet, 7328 billes parmi les 7731 (95%) reconnues par des anti-nHLA « prototypiques » avaient une MFI inférieure à 1000 après traitement acide.

Nous avons également étudié un à un les profils des patients afin d'identifier, si possible, le ou les épitopes natifs ou cryptiques reconnus, sur la base de ce qui avait été décrit dans la littérature. Ces résultats n'ont pas été présentés dans nos articles. Parmi les 126 patients ayant des anti-dHLA, seulement 27 (21%) avaient un profil pouvant être parfaitement expliqué par des épitopes répertoriés par El-Awar et coll. (343). Il est important de noter que ces auteurs n'ont réalisé leur étude épitopique qu'à l'aide de sérums monospécifiques, locus monospécifiques ou bien quelques sérums polyspécifiques pour lesquels tous les antigènes positifs avaient a priori un seul épitope commun. Ainsi, la moitié des épitopes décrits (30/58) étaient des épitopes limités à un seul antigène et ne concernaient que 28 (29%) des 97 allèles testés en SAG. Il est donc évident que leur étude ne décrivait qu'une faible partie des épitopes cryptiques pouvant être reconnus par des anti-dHLA. De plus leur population était différente de la nôtre, qui était constituée de patients ayant pour la plupart subi des événements immunisants (en particulier une ou plusieurs transplantations). Nous ne pouvons donc pas exclure que certains des anti-dHLA identifiés dans notre cohorte soient secondaires à une allo-immunisation et ainsi reconnaissent des épitopes différents de ceux qui sont dits « naturels ». Par ailleurs, la complexité des profils des patients immunisés rendait souvent l'analyse épitopique difficile voire impossible, en particulier lorsque la reconnaissance de certains antigènes pouvaient être attribuée à la fois à des épitopes natifs et des épitopes cryptiques.

De manière intéressante, les anti-dHLA étaient plus souvent retrouvés parmi les anti-HLA-Cw, puis les anti-A et les anti-B. De plus, au sein de chaque locus, certains allèles étaient plus fréquemment reconnus par les anti-dHLA. Cette hétérogénéité n'est pas clairement élucidée, mais il est possible que les antigènes non HLA engendrant une réponse humorale anti-HLA dénaturé possèdent des épitopes plus fréquemment portés par certains antigènes HLA. Il est également possible que certains antigènes soient plus résistants que d'autres à la dénaturation ayant lieu lors de l'adsorption sur les billes au moment de leur préparation chez le fournisseur. Alors même que les anti-dHLA reconnaissant des antigènes HLA-Cw étaient les plus fréquents, peu de XM CMF les ont testés. En effet, à l'époque où nous avons réalisé cette étude, le typage HLA-Cw n'était pas réalisé en systématique pour nos donneurs locaux et peu pour les donneurs extérieurs.

Un autre aspect de notre travail n'est pas non plus visible dans l'article. Il s'agit de notre collaboration avec le Dr Valérie Dubois (laboratoire HLA, EFS Lyon) à laquelle nous avons envoyé 14 sérums contenant des anti-dHLA pour qu'ils soient testés avec les kits SAG du seul autre fournisseur concurrent existant actuellement (Immucor[®], 81 allèles classe I en commun avec les kits One Lambda[®] pour les lots utilisés pour ce travail : lot 006 pour One Lambda[®] et lot 02283 03203F-SA1 pour Immucor[®]). Ces sérums étaient sélectionnés pour tester le plus d'anti-dHLA possible sur billes non traitées, le traitement acide ne fonctionnant pas (bruit de fond important) sur ces kits. Au total, 1134 allèles ont été testés avec les 2 kits, 445 étant positifs avec les kits One Lambda dont 109 (24,5%) étaient reconnus par des anti-dHLA. Parmi ces derniers, 27 avaient été testé en XM CMF et étaient négatifs dont 18 (67%) étaient aussi positifs avec le kit Immucor[®]. Nous démontrions donc que les kits en provenance des deux fournisseurs souffraient de la détection d'anti-dHLA.

La forte prévalence des anti-dHLA suggérait un impact non négligeable de ces anticorps sur l'accès à la greffe, impact que notre collaboration avec l'Agence de la Biomédecine a permis d'estimer avec précision, en tenant compte des haplotypes présents dans la population et non en se basant uniquement sur le pourcentage de représentation des allèles pris de manière individuelle, comme cela avait été fait dans un autre travail récemment publié (337). Les patients les plus affectés étaient ceux ayant une immunisation faible à intermédiaire. Les premiers ne devraient que peu souffrir d'une telle interférence, en revanche les patients ayant un TGI au-delà de 40% pourraient bénéficier d'un meilleur accès à la greffe si l'on ne tenait pas compte des anti-dHLA. L'impact sur les hyper immunisés était négligeable, sans doute parce que ces patients avaient plus d'explications allogéniques à leur immunisation souvent large (patients déjà greffés notamment), ce qui diluait cette immunisation anti-HLA dénaturé et la rendant peu ou pas détectable.

L'exploration des XM positifs avec certains anti-dHLA et celle des anti-nHLA intermédiaires a constitué le travail du deuxième article qui démontrait pour la première fois qu'il existait des mélanges d'anti-nHLA et d'anti-dHLA dans le sérum des patients. Cet article souligne le fait qu'il soit nécessaire d'interpréter avec précaution le test par traitement acide des billes, et la nécessité de confirmer l'identification d'un anti-dHLA par d'autres tests, tels que le XM CMF, quand il peut être utilisé, ou les iBeads[®].

Nous avons alors réalisé une étude approfondie des iBeads[®] en étudiant un plus grand nombre de patients et en réalisant plus de XM CMF. Celle-ci montrait la possibilité de les utiliser en routine hospitalière, en connaissant leurs limites : moindre sensibilité que les billes

SAG classe I « classiques » et persistance de molécules HLA dénaturées à leur surface, ce en fonction des loci considérés.

Ces trois premiers articles ne répondaient pas directement à la question de la signification clinique des anti-dHLA préformés, tout notre raisonnement étant basé sur le résultat des XM CMF. En effet, une méta-analyse a conclu que les DSA préformés détectés par les techniques SAG mais ne positivant pas le XM CMF augmentaient le risque de survenue de rejet humoral aigu et de perte de greffon (220). Cependant, cette analyse a été réalisée à partir de 6 études utilisant des seuils de positivité de XM CMF différents, nous ne pouvons pas donc exclure la possibilité que certains XM CMF négatifs dans une étude aient été positifs dans une autre et les faibles « *risk ratio* » observés par ces auteurs doivent être considérés avec précaution.

Nous avons alors mené une étude clinique rétrospective chez nos patients transplantés avec DSA préformés afin de déterminer si oui ou non les anti-dHLA étaient pathogènes. Nous n'avons pas retrouvé de rejet ni d'impact sur la survie du greffon chez ces patients. Cependant, l'effectif étudié était très faible car les anti-dHLA étaient jusqu'à présent considérés comme les anti-nHLA dans notre stratégie pré-greffe d'interdiction des antigènes dans le logiciel d'attribution des greffons Cristal de l'Agence de la Biomédecine. Il est donc difficile de conclure définitivement quant à la signification clinique des anti-dHLA à la seule lecture de notre travail.

Il a été décrit que les cellules peuvent exprimer à leur surface de faibles quantités de molécules HLA ayant perdu leur B2M et/ou leur peptide. En parallèle à nos observations en SAG, les FHC ont été identifiées au sein de notre groupe comme pouvant constituer un ligand de stress reconnu par les lymphocytes T gamma-delta. En effet, ces molécules ont été montrées comme surexprimées par les fibroblastes infectés par le cytomégalo virus humain. Nous n'avons pas établi de corrélation entre la séropositivité CMV et la présence d'anti-dHLA dans notre cohorte (résultats non montrés). Par ailleurs les anti-dHLA que nous avons identifiés n'étaient pas des auto-anticorps et il n'est pas sûr que le traitement acide conduise au même type de molécules HLA de classe I dénaturées que celle exprimées par les cellules infectées par le CMV. La possible coopération entre anti-dHLA et lymphocytes T gamma-delta dans le rejet de greffe reste donc à explorer.

Par ailleurs, le traitement acide des billes est un moyen artificiel de générer des molécules HLA dénaturées, et nous ne savons pas si la conformation de celles-ci est similaire aux FHC naturellement exprimées par des cellules. De même, le traitement acide pourrait générer des formes en partie ou totalement différentes de celles exprimées par les billes classiques. En effet, nous avons observé un certain nombre de réactivités sur les billes traitées à l'acide qui n'étaient pas détectées sur les billes non traitées, mais nous ne les avons pas explorées, même si elles sont mentionnées dans la Figure 1 du premier article. Récemment, Cai et coll. ont proposé un autre moyen de dénaturer les molécules HLA, c'est-à-dire par chauffage à 90°C pendant 5 minutes (349). Malheureusement les auteurs ne montrent pas de marquages W6/32 et HC-10 de celles-ci et nous ne savons pas si ce traitement est comparable au traitement acide.

Nous n'avons pas exploré l'existence d'anti-dHLA dirigés contre des antigènes de classe II. En effet, Morales-Buenrostro et coll. ont décrit dans leur cohorte une prévalence de 23% d'anticorps anti-HLA de classe II « naturels » (133). Cette prévalence était de 34% dans l'étude de Gombos et coll. (337). Cependant aucune de ces deux études n'utilisait de test

cellulaire pour confirmer ou infirmer la capacité de ces anticorps à reconnaître des molécules HLA natives ou dénaturées. Une troisième étude s'est intéressée à un profil particulier en SAG classe II, présent également chez des sujets sans évènement immunisant (372). Ces derniers auteurs ont en effet utilisé le XM CMF et des expériences d'adsorption/élution afin de montrer que les anticorps représentés dans ce profil n'étaient pas capables de reconnaître des cellules normales. En revanche, ils précisaient également que le traitement acide des billes de SAG classe II ne permettait pas de conclure quant à la reconnaissance par ces anticorps de molécules HLA de classe II dénaturées, fait que nous avons également observé lors des quelques tests que nous avons réalisés au sein de notre laboratoire. Par ailleurs, l'étude des anti-HLA de classe II en XM CMF se complique par le fait que le sérum testé ne doive pas contenir d'anticorps anti-HLA de classe I, ou ceux-ci doivent être préalablement adsorbés, et qu'il est très fréquent d'avoir une réactivité non spécifique avec les lymphocytes B.

VII – Deuxième partie : Interférences négatives en Single Antigen Luminex®

VII-1 – Cinquième article : Analyse de l'interférence liée au complément dans les tests utilisés pour la détection et l'identification des anticorps anti-HLA en format Luminex®

Article publié dans la revue *Transplantation*

« Deciphering Complement Interference in Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Detection With Flow Beads Assays »

Jonathan Visentin, Margaux Vigata, Sophie Daburon, Cécile Contin-Bordes, Véronique Fremeaux-Bacchi, Claire Dromer, Marc-Alain Billes, Martine Neau-Cransac, Gwendaline Guidicelli and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

Ce travail fait suite à l'observation de l'effet « prozone » qui conduit à la sous-estimation voire à l'absence de détection d'anticorps anti-HLA de forte MFI (334), et incriminant initialement le complexe C1, première molécule impliquée dans la cascade d'activation de la voie classique du complément. L'hypothèse avancée concernant le mécanisme de l'interférence était que l'association des composants C1r et C1s à C1q empêchait la fixation de l'anti-IgG fluorescent aux anticorps anti-HLA liés aux billes en raison d'un encombrement stérique (335).

Notre hypothèse était que le complexe C1 ne pouvait pas être suffisant à lui seul. En effet, C1r et C1s sont de petite taille en comparaison à C1q, et de nombreux autres produits de la cascade du complément sont capables de se lier à la surface activatrice. Notamment, plusieurs équipes ont décrit la possibilité de détecter les fragments de dégradation du C4 et du C3 à la surface des billes SAG (173, 224, 362).

Nous avons alors employé un modèle expérimental utilisant le W6/32 à forte concentration et des sérums déficients en certains facteurs du complément afin d'analyser pas à pas chaque étape de la cascade, et ainsi identifier les acteurs impliqués. Nous avons ensuite confirmé nos résultats à l'aide de sérums de patients.

Mon rôle dans cette étude a consisté en la réalisation des expériences, aidé de Margaux Vigata alors externe en pharmacie au sein de notre laboratoire et que j'ai formée à cet objectif, puis en l'analyse des résultats obtenus et la rédaction de l'article.

Notre modèle expérimental mettait en évidence que la détection des IgG anti-HLA n'était pas gênée tant que l'on n'atteignait pas l'étape d'activation de C4 dans la cascade, c'est-à-dire en présence d'un sérum déficient en facteur C2. Dans cette dernière condition, nous n'observions qu'une diminution partielle de la MFI, donc un blocage partiel de la détection des IgG. Le blocage devenait quasiment complet lorsque l'on atteignait l'étape d'activation et donc de dépôt de C3, c'est-à-dire en présence d'un sérum déficient en facteur C5. L'amplification du dépôt de C3 par la voie alterne jouait un rôle significatif (sérum déficient en facteur B), alors que les facteurs C2 et C5 (et les suivants) ne jouaient aucun rôle, comme l'indiquait la comparaison des MFI obtenues avec les sérums déficients en C2 et C3, puis déficient en C5 et sans traitement, respectivement (Figure 1, panel du haut). Les

marquages C1q, C4d et C3d réalisés dans les mêmes conditions que les marquages IgG permettaient effectivement de vérifier le dépôt de ces différents éléments à la surface des billes, et que les IgG n'étaient pas les seules à pouvoir être masquées (Figure 1, panels du milieu et du bas). En effet, la détection du C1q était gênée par les dépôts de C4 (sérum déficient en C2 et C3) puis C3 (sérum déficient en C5 et sérum brut), et la détection des dépôts de C4 par les dépôts de C3 (sérum déficient en C5 et sérum brut). Nous avons observé le même phénomène dans 4 sérum de patients montrant une interférence en classe I ou en classe II (Figures 2 et 3). Les dépôts des facteurs C1q, C4 et C3 étaient corrélés au niveau de MFI IgG, mais plus faiblement pour le C1q en comparaison au C4 et C3 (Figure 4).

**Title: Deciphering complement interference in anti-HLA antibody detection
with flow beads assays**

Authors: Jonathan VISENTIN^{1,2}, Margaux VIGATA¹, Sophie DABURON², Cécile CONTIN-BORDES^{1,2}, Véronique FREMEAUX-BACCHI³, Claire DROMER⁴, Marc-Alain BILLES⁵, Martine NEAU-CRANSAC⁶, Gwendaline GUIDICELLI¹ and Jean-Luc TAUPIN^{1,2}.

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France ; ²UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux, Talence, France ;

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Laboratoire d'immunologie biologique, Paris, France ;

⁴Service des Maladies Respiratoires, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France ; ⁵Service de Chirurgie Cardiaque, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France ; ⁶Service de Transplantation Hépatique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

Keywords: HLA antibodies, single antigen flow beads, prozone phenomenon, interference, complement.

Word count: Abstract 241 words, Text 2681 words

Tables and figures: Tables: 0, Total figures : 5, Color figures : 1.

Address for correspondence :

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Tel +33 5-57-82-08-84 / Fax +33 5-56-79-60-79

Email jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Footnotes:**Author's contribution:**

J.T., J.V. and G.G. contributed to the design of the study. J.T. and J.V. participated in the writing of the paper. J.V., M.V., S.D., G.G. and J.T. participated in the performance of the research. J.V. and J.T. participated in data analysis. C.C., V.F., C.D., M.B. and M.N. were involved in critical revision of the manuscript.

Address correspondence to: Professor Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux,

Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France

Email : jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Abbreviations:

Mab: Monoclonal antibody(ies)

MFI: Mean Fluorescence Intensity

SAFB: Single Antigen Flow Beads

SFB: Screening Flow Beads

Abstract

Background. Anti-HLA antibody detection in solid-phase flow beads assays can be quenched by complement activation but the precise mechanism of this interference is not fully elucidated yet.

Methods. Using the Luminex[®] flow beads screening assay for detection of anti-HLA antibodies, we analyzed the binding of high concentrations of the pan class I anti-HLA monoclonal antibody W6/32 in neat normal, EDTA-treated normal, and complement factor C1q, C4/C3, C2, C3, Factor B or C5-depleted human sera, using anti-mouse IgG as the detection antibody. Complement activation and binding to beads was revealed using anti-human C1q, C4d and C3d antibodies. To translate our findings to the human setting, we used the class I and class II HLA single antigen flow beads assays and sera from four patients with high titers of antibodies.

Results. Detection of W6/32 did not suffer any interference with C1q and C4/C3-depleted sera. A partial quenching was observed with C2, C3 and Factor B-depleted sera, but was more pronounced with the Factor B-depleted serum. W6/32 was undetectable in presence of C5-depleted serum. The binding of activation products derived from C3 principally, and also from C4, impaired IgG and C1q detection. Accordingly, C4d detection was hindered by deposition of activated C3. Similar findings were obtained with patients' sera.

Conclusion. Binding of C4 and C3 activation products is the main responsible for complement interference in flow beads assays. A complete quenching requires complement activation through C3 cleavage and its amplification by the alternative pathway.

Introduction

One of the best known interference in immunoassays is the prozone phenomenon, which leads to false-negative results or underestimation of analyte concentration because of an excess of the antigens or antibodies to be detected. First described in agglutination and precipitation assays (1), it was later observed as the “hook effect”, particularly in single-step sandwich immunoassays where capture and detection antibodies, added simultaneously, are both saturated by an excess of the analyte to be measured, thereby impairing the formation of the ternary complex (2). Recently, another interference resembling the prozone phenomenon, leading to an underestimation or worse to the absence of detection of high titer antibodies, has been reported with single antigen flow beads assay (SAFB) for anti-HLA antibodies (3, 4). It was reverted by treating the serum with EDTA, C1-inhibitor, dithiothreitol or 56°C heating for 30 minutes (3, 5), all having in common the ability to disrupt the complement C1 complex which associates in a calcium-dependent manner the C1q, C1r and C1s proteins. Because of its large size, C1 was expected to sterically prevent the binding of the anti-human IgG detection antibody (5).

C1q binding to IgG is the first step of the complement classical pathway. It leads to activation of C1s (6) which cleaves C4 into C4a and C4b, the latter being stabilized by covalent linkage on the activating surface (7). Then C2 binds C4b and is cleaved by C1s into C2a and C2b. The C4b2a molecule constitutes the classical C3 convertase cleaving C3 into C3a and C3b. C3b covalently binds to the surface, and can also associate with Factor B to form the alternative C3-convertase C3bBb triggering an explosive amplification loop of C3b formation (8). As covalently linked C4b and above all C3b are known to accumulate at the site of complement activation, one could hypothesize that complement components downstream C1 are implicated in the interference observed with flow beads assays. In line with this,

Schwaiger et al. have very recently proposed that C3 activation, not C1 binding, has the central role in the prozone phenomenon (9), but its precise mechanism was not elucidated. Indeed, on the one hand, the authors used methylamine to inactivate the internal thioester reactive group from C4 and C3, precluding assessment of the respective involvement of each component in the interference. On the second hand, they used cobra venom factor which cleaves factor C3. As C3 is at the crossroad of both the classical and alternative pathways, the possible impact of C3 activation amplification loop through alternative C3 convertase formation was not explored.

Therefore, the aim of our study was to precisely decipher the complement interference phenomenon mechanism on screening flow beads (SFB) and SAFB, using the mouse monoclonal antibody (Mab) pan class I anti-HLA W6/32, human sera from strongly HLA sensitized patients, complement factors depleted human sera and Mab against C1q, C4d and C3d.

Results

Deciphering the complement interference mechanism with W6/32 and the SFB assay

W6/32 was used in the SFB assay with human sera deficient or not in selective complement factors (Figure 1, top panel). We selected a W6/32 concentration (20µg/ml) which provided a saturating signal, i.e. higher than 20000 Mean Fluorescence Intensity (MFI) when diluted in a serum-free matrix (data not shown). In this condition, IgG binding was barely detectable when SFB were incubated with W6/32 in neat normal serum. Therefore, W6/32 at 20µg/ml activates complement on SFB surface, drastically quenching IgG detection. Saturating MFI signal was recovered in the presence of EDTA in normal serum, as well as with the use of C1q-depleted serum.

We then used a C4/C3-depleted serum which contained functional C1 but lacked C4 and C3. The detection of W6/32 binding was similar to the EDTA-treated normal serum condition, showing that the C1 complex was not responsible for the interference. To explore the influence of C4 activation, we then used a C2-depleted serum. The C2-depleted serum induced a partial interference, as W6/32 binding was detectable at a lower level than EDTA-treated normal serum, but still significant. To explore the influence of C2, we used a C3-depleted serum. The C3-depleted serum did not induce a higher interference than the C2-depleted serum. To explore the influence of C3, we used first, a C5-depleted serum for which IgG binding was in the same order of magnitude as with neat normal serum, and second a B-depleted serum for which the alternative pathway is impaired. With the B-depleted serum, detectable IgG binding lied between neat normal and C2 or C3 depleted sera.

Direct detection of complement deposition in the SFB assay

We reproduced the same experiments to directly analyze the binding of C1q, C4d and C3d with the adequate specific antibodies. C1q detection on SFB (Figure 1, top middle panel) was maximal with EDTA-treated normal serum and C4/C3 depleted serum, was partially quenched in the presence of the C2- and C3-depleted sera, and was abolished with neat normal, C5 and B-depleted sera. Detection of C4d on SFB (Figure 1, bottom middle panel) was maximal with the C2 and C3-depleted sera, was nearly abolished with B-depleted serum, and was completely quenched with neat and C5-depleted sera. Finally, we detected C3d on beads in the presence of neat, C5 and B-depleted sera (Figure 1, bottom panel), but to a lesser extent with B-depleted sera.

Complement interference with the SAFB assay and patients' sera

We selected 4 patients whose serum displayed an EDTA-sensitive interference in class I (n=2) or in class II (n=2) SAFB assays. Sera were first treated with EDTA to block complement activation, then incubated with the SAFB and washed, before addition of neat or EDTA-treated normal serum to provide identical amounts of complement factors to all tested conditions. Serum IgG anti-HLA antibody binding was detected using a labeled anti-IgG antiserum (Figure 2, top left panel).

Among the 376 beads tested for the 4 samples, 96 were positive ($MFI \geq 1000$) in EDTA-treated condition (n=52 class I and n=44 class II). Of them, 52 were affected by complement interference with neat normal serum (n=21 class I and n=31 class II) as defined in the materials and methods section. The interference became more pronounced as MFI values in EDTA-treated condition increased, with a median MFI value of 19982 (5th-95th percentiles 15533-21564) for beads displaying interference. The same approach was conducted using C3-depleted (Figure 2, bottom left panel), C5-depleted (Figure 2, top right

panel) and B-depleted (Figure 2, bottom right panel) sera instead of neat normal serum. Significant interference with C3-depleted serum was observed for 23 (44%) beads among the 52 previously identified, and especially for those with the highest MFI in EDTA-treated condition (median 20585, 5th-95th percentiles 19790-22009). For the C5-depleted serum, interference was exacerbated, with 51 (98%) beads involved. Moreover, the MFI measured for C5-depleted sera were identical to those for neat normal serum ($p=0.39$). For the B-depleted serum, interference was also observed, 48 (92%) beads being involved, but was only partial as MFI were higher than for neat normal serum ($p<0.0001$).

Direct detection of complement deposition in the SAFB assay

We analyzed the binding of complement factors on SAFB with patients' sera. As described with W6/32 and SFB assay, C1q detection was partially quenched with C3-depleted serum, and completely abrogated with B-depleted and neat normal sera (Figure 3A). Accordingly, C4d detection was partially impaired with B-depleted serum, and completely abrogated with neat normal serum (Figure 3B).

IgG binding in EDTA-treated condition was correlated with C1q (Figure 4, top left panel, EDTA-treated serum), C4d (Figure 4, bottom left panel, C3-depleted serum) and C3d binding (Figure 4, top and bottom right panels for neat normal and B-depleted sera respectively), although less for C1q when compared to C4d and C3d which increased more gradually with IgG MFI strength. Moreover, C3d binding MFI with B-depleted serum was lower than with neat normal serum ($p<0.0001$).

Discussion

Using the pan class I anti-HLA W6/32 Mab and the SFB assay for anti-HLA antibody detection, we firstly confirmed the reports by Schnaidt et al. (3) and Schwaiger et al. (9) that the prozone phenomenon is caused by immune complex dependent complement activation on the beads. However, in contrast with the conclusions reached by the authors of the first seminal report who pointed C1 as the culprit via a steric hindrance due to its large size, the authors of the second and very recent report have demonstrated that C1 complex binding has not the central role, because the interference can be reverted with methylamine and cobra venom factor which do not alter C1 complex structure.

Using a different approach, we also clearly demonstrated the innocence of C1 although it is a mandatory accomplice by binding the IgG during the inescapable first step of the classical pathway activation. Indeed, the C4/C3 depleted serum, which still contains the intact C1 molecule, did not impair the detection of the IgG anti-HLA antibody with the anti-IgG secondary antibody, whereas it completely blocks any further progression of the complement cascade.

Schwaiger et al. (9) postulated that other complement components could be incriminated and they identified C3 as having the central role through classical complement pathway activation. However, methylamine and cobra venom factor do not allow precisely identifying the actors of the interference, as methylamine inactivates both C4 and C3, and cobra venom factor cleaves C3 which belongs to both the classical and alternative pathways. In contrast, in our study, the use of depleted sera allowed analyzing complement activation step by step, and we unequivocally demonstrated that not only C3 but also C4 can be responsible for the interference, and that the classical pathway needs the help of the alternative pathway in order to achieve maximal C3 deposition. Then, instead of claiming that C3 has the central role in

the interference of IgG detection through classical complement pathway activation, one should rather say that C3 has the final role, through C4 sterical interference emphasizing and association with Factor B which allows alternative pathway amplification loop.

Interestingly, as for IgG, C1q detection suffered interference due to C4 and C3 deposition and C4 detection suffered interference due to C3 deposition. Hence, deposited complement components not only interfere with anti-HLA antibodies detection, but also interfere with each other, and C4 then C3 appear able to mask the complement components previously recruited onto bead surface.

The SAFB assay was previously modified in order to measure the ability of anti-HLA antibodies to activate complement assessed with C4d detection (10-13) and the different groups all have obtained relatively low MFI strengths. Similarly, Schwaiger et al. reported bead events displaying strong complement interference without any C1q or C4d binding, and a weaker C4d staining when compared to C3d leading to the conclusion that C4d was deposited only in traces. Noteworthy, all these studies were performed using patients' neat sera. Using appropriate conditions, i.e. with C2 and C3-depleted sera, we demonstrated that C4 has accumulated in situations where a strong interference quenched IgG binding detection, suggesting that the low MFI observed in these previous studies were caused by C3 interference for C4d detection.

Interestingly, C1q binding was detectable only in the presence of the highest amounts of IgG, as assessed by very high MFI for IgG binding, and more rapidly and sharply faded than C4d and C3d detection when IgG MFI decreased. A possible explanation is that the required density of anti-HLA antibody on the beads for a sustainable binding (and therefore detection) of C1q is higher than for C4 and C3. Indeed, unlike C4 and C3, C1q is not capable of covalent and stable linkage to the bead surface and the minimal two neighboring IgG molecules able to provoke complement activation might not durably hold C1q at the bead surface, whereas a

higher IgG density, allowing more IgG to interact with more C1q monomers, could increase avidity and then stabilize the interaction (14, 15).

To conclude, we suggest a reassessment of the mechanism of the complement interference proposed by Weinstock et al. (5) (Figure 5). If antigen density is high enough and a sufficient amount of anti-HLA antibodies interacts with the HLA molecules adsorbed on the solid phase, C1 binding and activation is then allowed. C4 is recruited and cleaved into its C4b fragment which covalently binds to the acceptable sites provided by proteins nearby such as HLA proteins, C1 and the anti-HLA antibodies, thereby partially interfering with their own detection. Subsequent binding of C2 and activation into C2a which associates with C4b does not significantly enhance the interference, but allows C3 cleavage into the highly reactive C3b. Finally, C3b binding to the proteins piled up onto the bead surface achieves the interference through the alternative pathway amplification loop, quenching IgG, C1q and C4 detection.

Materials and methods

Reagents and human sera

The LABScreen® Mixed Class I and II (LSM12 lot 18), LABScreen® Single Antigen class I (LS1A04 lot 8, 97 alleles tested) and class II (LS2A01 lot 9, 91 alleles tested) SAFB assay kits were from One Lambda. The PE-labeled Goat Anti-Human IgG antibody (ref LS-AB2, One Lambda) and the PE-labeled Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Mouse IgG (Beckman Coulter) were used at a 1/100 dilution. The mouse Mab pan class I anti-HLA W6/32 was from Thermo Fisher Scientific. Mouse biotinylated anti-C1q, anti-C4d and anti-C3d Mab (Quidel) and PE-labeled Streptavidin (Beckman Coulter) were used at 1/100 and 1/200 dilutions respectively. The anti-C4d and anti-C3d antibodies recognized epitopes which are also accessible in fragments C4b and C3b, respectively, and all the other covalently linked intermediates leading to their final degradation products C4d and C3d, respectively. Hence these antibodies allowed measuring all C4 and C3 activation products which were covalently bound on bead surface. The normal serum was from a male volunteer healthy subject who has never been transfused nor transplanted. Blood was rapidly centrifuged after sampling, aliquoted and immediately frozen at -80°C. For the EDTA assay, a 0.1 M solution of disodium EDTA (Sigma-Aldrich) at pH=7.4, or water as a control, was diluted 1/10 in the serum and incubated for 10 min before SAFB testing. The C1q-depleted, C4 and C3-depleted (i.e. C4/C3-depleted serum), C2-depleted, C3-depleted, C5-depleted and B-depleted sera (all from Quidel) were supplemented with CaCl₂ and MgCl₂ (Sigma-Aldrich) in order to bring a Ca²⁺ and Mg²⁺ minimal concentrations of 2.4 and 0.8 mM, respectively. Sera from four HLA-sensitized transplanted patients and sampled from 3 men (one lung, one liver and one heart recipients) and 1 woman (liver recipient), were used. They displayed complement interference in our routine SAFB assay, as arbitrarily defined by the presence of at least one bead with both a

MFI higher than 10000 after EDTA-treatment and an EDTA-treated/neat serum MFI ratio above 2. The rationale for the selection of these thresholds relies on the facts that such antibody reactivities are expected to provide high MFI signals when the interference is circumvented, and EDTA-treatment is expected to increase MFI above the observed inter-assay variations (local variation coefficient mean is of 13%).

Anti-HLA antibody assays

The SFB and SAFB assays were performed according to manufacturer's recommendations for routine assay use. MFI values for W6/32, C1q, C4d and C3d binding with SFB are depicted as raw values. Measured MFI values for anti-HLA IgG staining for patients' sera with SAFB were normalized using the baseline formula proposed by the Fusion 3.2[®] software (One Lambda): Normalized MFI = [(Bead #N MFI) – (Negative Control bead MFI)] – [(Background Negative Control Serum MFI for bead #N) – (Background Negative Control Serum MFI for Negative Control bead)]. Our routine practice considers a positivity threshold of a MFI of 1000 and includes class I and class II positive control sera derived from allosensitized patients covering a wide MFI range. The MFI limits below which the presence of complement interference was suspected corresponded to the linear regression of the mean \pm three standard deviations for the different MFI values considered, and were applied to EDTA-treated serum condition in comparison with neat, C3-depleted, C5-depleted and B-depleted sera conditions. Measured MFI values for C1q, C4d and C3d binding were normalized by subtraction of the negative control bead value.

Statistical analysis

Descriptive statistics used median and 5th-95th percentiles; study of paired quantitative variables the two-tailed Wilcoxon test. Degree of relationship between variables was

calculated using Spearman's coefficient of rank correlation ρ . Analyses were performed with MedCalc[®] software (MedCalc Software).

References

1. Heidelberger M, Kendall FE. A Quantitative Theory of the Precipitin Reaction : Iii. The Reaction between Crystalline Egg Albumin and Its Homologous Antibody. *J Exp Med* 1935; 62 (5): 697.
2. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999; 36 (Pt 6): 704.
3. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92 (5): 510.
4. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl Immunol* 2013; 29 (1-4): 17.
5. Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet* 2013; 40 (3): 171.
6. Budayova-Spano M, Lacroix M, Thielens NM, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J* 2002; 21 (3): 231.
7. Dodds AW, Ren XD, Willis AC, Law SK. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature* 1996; 379 (6561): 177.
8. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol* 2004; 138 (3): 439.
9. Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, Eskandary F, Bohmig GA. Complement Component C3 Activation: The Leading Cause of the Prozone Phenomenon Affecting HLA Antibody Detection on Single-Antigen Beads. *Transplantation* 2014.
10. Wahrmann M, Exner M, Haidbauer B, et al. [C4d]FlowPRA screening--a specific assay for selective detection of complement-activating anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 2005; 66 (5): 526.
11. Smith JD, Hamour IM, Banner NR, Rose ML. C4d fixing, luminex binding antibodies - a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7 (12): 2809.

12. Wahrmann M, Bartel G, Exner M, et al. Clinical relevance of preformed C4d-fixing and non-C4d-fixing HLA single antigen reactivity in renal allograft recipients. *Transpl Int* 2009; 22 (10): 982.
13. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Systematic comparison of four cell- and Luminex-based methods for assessment of complement-activating HLA antibodies. *Transplantation* 2013; 95 (5): 694.
14. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988; 332 (6166): 738.
15. Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 2014; 343 (6176): 1260.

Figures

Figure 1: Steps of the complement cascade involved in the interference phenomenon.

SFB were incubated with W6/32 (20 µg/ml) in neat or EDTA-treated normal, C1q-depleted, C4/C3-depleted, C2-depleted, C3-depleted, C5-depleted and B-depleted sera. Then IgG (top panel), C1q (middle top panel), C4d (middle bottom panel) and C3d (bottom panel) binding was revealed. The negative control condition corresponded to neat normal serum without W6/32. Are depicted mean \pm SD of MFI on HLA class I beads for three different assays.

Figure 2: Complement interference on SAFB with sera from patients. EDTA-treated sera from four patients were incubated with class I (n=2, black and white circles) or class II (n=2, black and white triangles) SAFB. After washes, the SAFB were incubated with neat normal (top left panel), C3-depleted (bottom left panel), C5-depleted (top right panel) or B-depleted (bottom right panel) sera and IgG binding was measured and compared to the IgG binding obtained with EDTA-treated normal serum. Only beads considered IgG positive (i.e. baseline MFI ≥ 1000) with EDTA-treated serum are presented. Full line represents line of equality and dashed lines correspond to the linear regression of the mean \pm three standard deviations for the MFI values of our routinely used positive control sera.

Figure 3: Interferences for C1q and C4d detection on SAFB. Sera from four patients were EDTA-treated and incubated with SAFB class I (n=2) and class II (n=2). After washes, SAFB were subsequently incubated with neat normal, EDTA-treated normal, C3-depleted or B-depleted sera, then C1q (Figure 3A) and C4d binding (Figure 3B) was revealed. The binding of C1q was analyzed for the EDTA-treated normal, C3-depleted, B-depleted and neat normal sera. The binding of C4d was analyzed for the C3-depleted, B-depleted and neat normal sera.

Only beads considered IgG positive (i.e. baseline MFI ≥ 1000) with EDTA-treated serum are presented.

Figure 4: Deposition of complement factors C1q, C4 and C3 on SAFB. EDTA-treated sera from four patients were incubated with class I (n=2, black and white circles) and class II (n=2, black and white triangles) SAFB. After washes, the SAFB were then incubated with EDTA-treated normal, C3-depleted, neat normal or B-depleted sera. Then, respectively, C1q (top left panel, EDTA-treated normal serum), C4d (bottom left panel, C3-depleted serum) and C3d (top and bottom right panels for neat normal and B-depleted sera, respectively) binding was measured and correlated with the IgG binding in the presence of EDTA-treated normal serum after the patient's serum washing step. Only beads considered IgG positive (i.e. baseline MFI ≥ 1000) with EDTA-treated serum are presented.

Figure 5: Comprehensive scheme of the complement interference. In the presence of high enough HLA density and anti-HLA antibodies, complement C1 binds and activates C4 into the highly reactive C4b moiety which covalently binds IgG and complement factor C1, thereby interfering with IgG and C1q detection. Subsequent cleavage of C2 into C2a, which associates to C4b, allows C3 activation into the covalently reacting C3b, whose production is amplified by the factor B-dependent complement alternative pathway. This leads to its binding to the remaining available sites on the anti-HLA antibodies and the previous complement components attached to the bead surface, namely C1q and C4b/C4d, masking them to the antibody conjugates. For the sake of clarity, no distinction is made between activation products C4b/C4d and C3b/C3d and factor B is not represented.

Figure 1

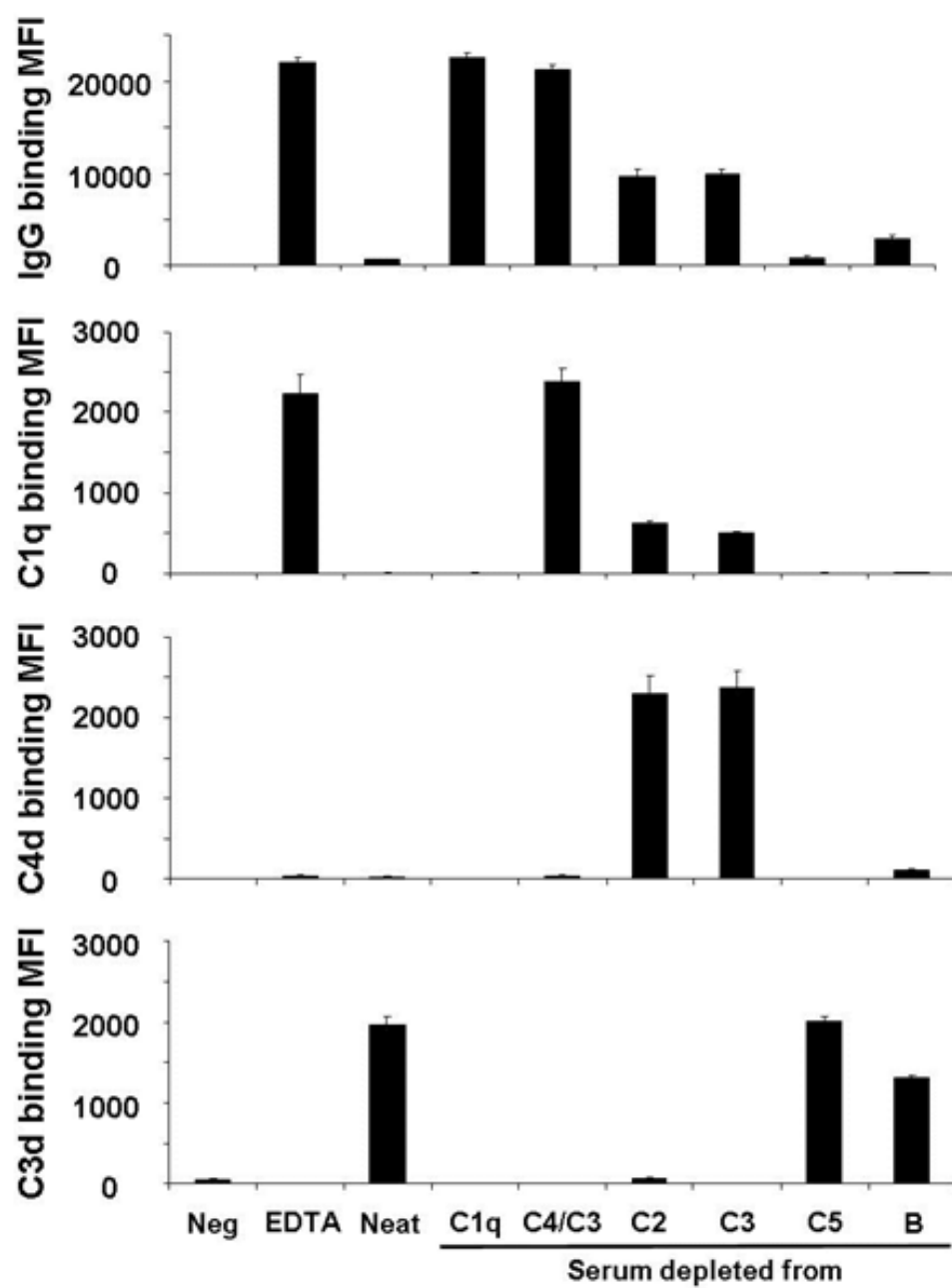


Figure 2

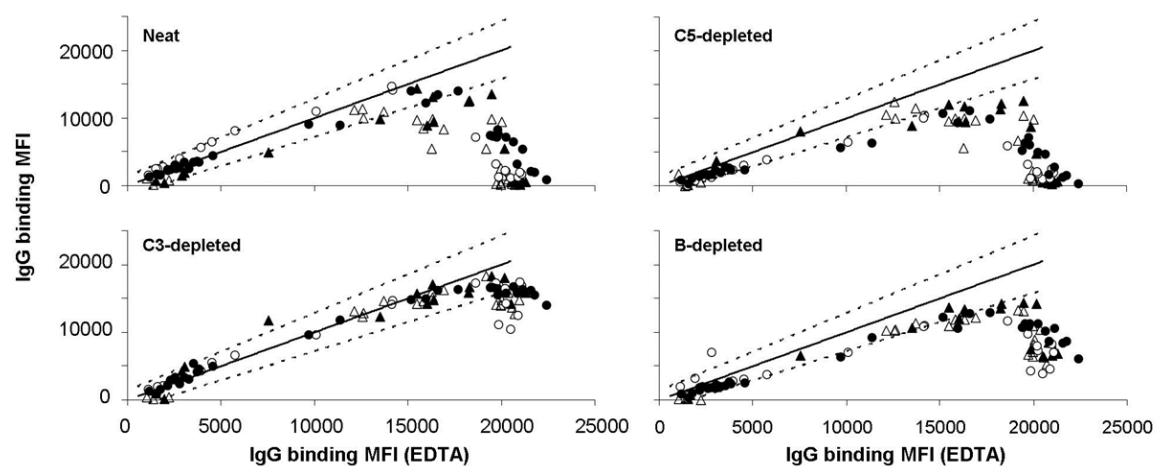


Figure 3

Figure 3A

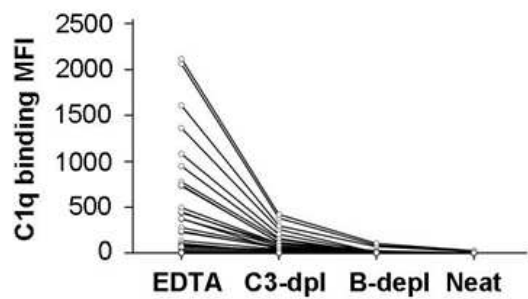


Figure 3B

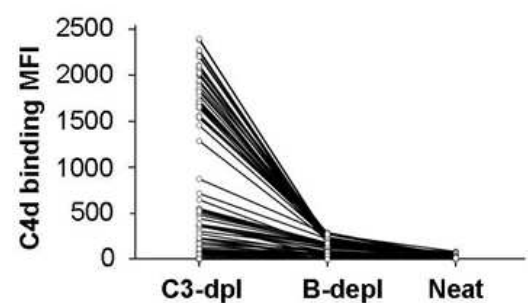


Figure 4

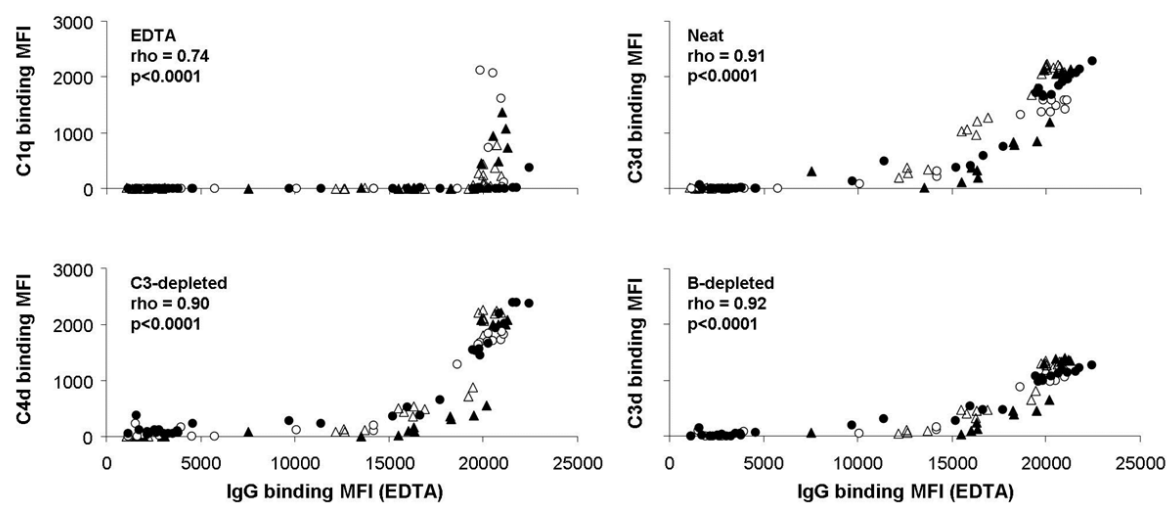
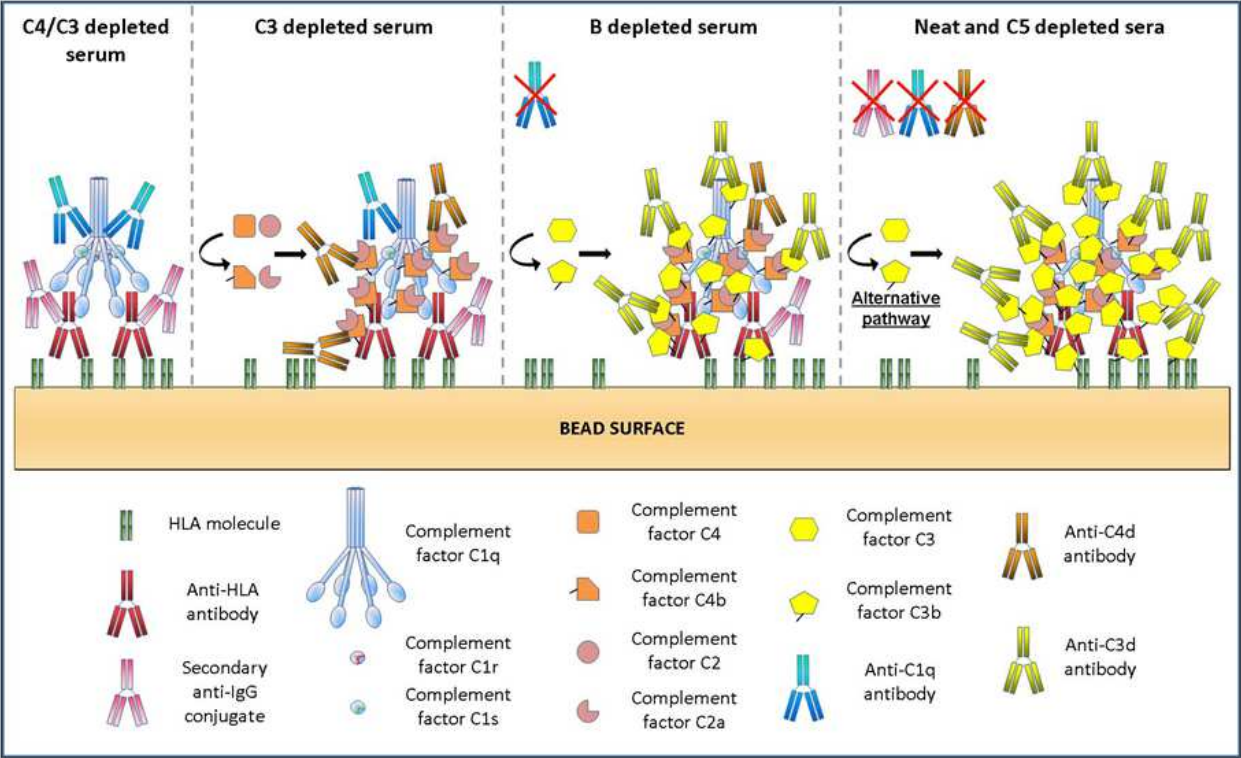


Figure 5



VII-2 – Sixième article : Analyse de l'interférence liée aux IgM pour la détection des IgG anti-HLA dans les tests en format Luminex®

Article soumis à la revue *Human Immunology*

« Deciphering IgM interference in IgG anti-HLA antibody detection with flow beads assays »

Jonathan Visentin, Gwendaline Guidicelli, Lionel Couzi, Pierre Merville, Jar-How Lee, Carmelo Di Primo and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

Ce travail fait suite à une observation que nous avons faite dans une cohorte de transplantés rénaux pour lesquels nous comparions la MFI des DSA obtenues en SAG classique détectant les IgG après traitement à l'EDTA des sérums, et la MFI de ces mêmes sérums pour les mêmes allèles dans le test adapté pour la mesure de la fixation du C1q (Courant M.*, Visentin J.* et al, article en cours de rédaction, *contribution au travail équivalente). Certains d'entre eux présentaient un fort marquage C1q en présence d'une MFI relativement faible en SAG classique malgré un prétraitement du sérum à l'EDTA. Ceci laissait penser que la fixation du C1q pouvait être due à la présence d'IgM anti-HLA reconnaissant les mêmes antigènes que ces IgG apparemment présentes en quantité insuffisante pour expliquer la force du signal C1q.

A cette époque, un article montrant un profil de ce type avait été publié dans *l'American Journal of Transplantation* (373). Les auteurs décrivaient que la titration par dilutions successives du sérum permettait de révéler la présence d'IgG anti-HLA de forte MFI, chose que le traitement par l'EDTA ne permettait pas de faire, et suggéraient que la titration constituait le seul de moyen de lever ce type d'interférence, sans pour autant en expliquer la provenance. Notre hypothèse, qui n'était pas soulevée par les auteurs et pour laquelle nous avons donc envoyé une lettre à l'éditeur publiée peu après (374), était que ce type de profil pouvait être lié à une interférence des IgM anti-HLA pour la détection des IgG anti-HLA. Ce type d'interférence avait déjà été suggéré par plusieurs équipes (332, 333), mais les approches utilisées, à savoir un traitement au DTT ou une dialyse hypotonique, ne permettaient pas de faire la part entre l'interférence liée au complément liée aux IgG et une réelle interférence des IgM. En effet, ces deux traitements agissent également sur le complexe C1. Par ailleurs, les moyens par lesquels les IgM étaient capables d'interférer n'avaient jamais été décrits.

Nous avons alors utilisé un modèle expérimental à base de trois anticorps monoclonaux reconnaissant les molécules HLA de classe I afin d'explorer les modes d'interférence des IgM anti-HLA avec les IgG. La compétition entre ces anticorps a préalablement été étudiée en SPR. Nous avons ensuite confirmé nos résultats à l'aide de sérums de patients ayant subi différents traitements : EDTA, DTT et dilutions en série.

Mon travail dans cette étude a consisté en la réalisation des expériences, en l'analyse des résultats obtenus puis en la rédaction de l'article.

Après avoir sélectionné des concentrations en W6/32 et en IgG anti-B2M n'engendrant pas d'activation de la voie classique du complément à la surface des billes de dépistages dans du sérum non-traité (Figure S1), nous avons introduit des concentrations croissantes d'IgM anti-B2M dans ce même sérum et observé une diminution croissante des MFI IgG (Figure 1). Nous avons également vérifié que l'IgM anti-B2M était capable de générer une interférence liée au complément, notamment pour sa propre détection (Figure S2). En utilisant du sérum traité à l'EDTA, nous avons mis en évidence une interférence liée à l'IgM anti-B2M pour les deux IgG monoclonales (Figure 2, panel A) et donc que l'IgM était aussi capable d'interférer indépendamment de l'activation du complément. De plus, cette interférence était plus forte pour l'IgG anti-B2M que pour le W6/32 (Figure 2, panel B). Ceci était à mettre en parallèle avec les tests de compétition réalisés en SPR, montrant que l'IgM anti-B2M entraînait en compétition directe pour la liaison aux molécules HLA avec l'IgG anti-B2M mais pas avec le W6/32 (Figures 3 et S3). Enfin, la comparaison des MFI IgG entre sérum non traité et sérum traité à l'EDTA mettait en évidence la capacité des IgM à interférer via l'activation du complément à la surface des billes (Figure 4, panel A). Le W6/32 était touché de manière plus importante que l'IgG anti-B2M (Figure 4, panel B). Nous avons ensuite exploré cette interférence au sein du sérum de deux patients ayant des DSA anti-HLA-DQ7 d'isotype IgG et IgM (Table 1). Nous avons mis en évidence des interférences liées aux IgM et indépendantes du complément (patient n°1 et 2, billes 1 et 2), et des interférences liées aux IgM dépendantes du complément (patient n°1, billes 3 à 5). La situation pouvait devenir bien plus complexe à analyser lorsque, en plus des IgM, les IgG pouvaient engendrer une interférence liée au complément (patient n°2, billes 3 à 5), mais ce cas montrait que des IgM en très grande quantité pouvaient interférer avec des IgG également présentes en très grande quantité. De plus, la dilution du sérum n'était pas un moyen approprié pour se dégager de l'interférence liée aux IgM (Figure 5), car la dilution s'applique aussi à l'IgG dans le même temps. Enfin, nous notons que ces DSA IgM pouvaient persister et interférer pendant de nombreux mois (Figure S4) ce qui est une notion qui reste à explorer car pourrait avoir un impact clinique.

**Title: Deciphering IgM interference in IgG anti-HLA antibody detection
with flow beads assays**

Authors: Jonathan VISENTIN^{a,b}, Gwendaline GUIDICELLI^a, Lionel COUZI^{b,c}, Pierre MERVILLE^{b,c}, Jar-How LEE^d, Carmelo DI PRIMO^{e,f} and Jean-Luc TAUPIN^{a,b,1}.

^aCHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France ; ^b Université de Bordeaux, UMR CNRS 5164 Talence, France ; ^c CHU de Bordeaux, Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France, ^d One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA; ^e Université de Bordeaux, Laboratoire ARNA, Bordeaux, France; ^f INSERM, U869, Laboratoire ARNA, Pessac, France, ¹ Present adress : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Paris, France

Adress for correspondence (Present adress):

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis

1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France

Tel +33 1-42-49-49-35 / Fax +33 1-42-49-52-47

Email jean-luc.taupin@aphp.fr

Abbreviated title: Deciphering IgM interference in flow beads assays

Conflict of interest:

J.L. is an employee of One Lambda Inc. The other authors of this manuscript have no other conflicts of interest to disclose.

Abstract

In flow beads assays, the interference of IgM for IgG anti-HLA antibodies detection is not precisely understood. Using the screening flow beads assay for class I HLA antibodies, we analyzed the binding of two IgG mAbs, the anti-class I HLA W6/32 and an anti-beta-2-microglobulin, in the presence of an anti-beta-2-microglobulin IgM mAb. In neat serum, the IgM mAb impaired the detection of both IgG. In EDTA-treated serum, the interference was stronger for the anti-beta-2-microglobulin IgG than for W6/32, in agreement with the finding in surface plasmon resonance that this IgM competed with the anti-beta-2-microglobulin IgG but not with W6/32. The IgM interference was higher in neat than in EDTA-treated serum for both IgG mAbs. The IgM interference was also analyzed with class II single antigen flow beads and sera from two kidney recipients containing IgG and IgM donor specific antibodies. Anti-HLA IgG detection was partially corrected by EDTA, and restored by IgM inactivation with DTT, confirming the results observed with the mAbs. Therefore, three mechanisms can explain the IgM interference for IgG anti-HLA antibodies in flow beads assays: direct competition for antigen, steric hindrance and complement activation.

Keywords: HLA antibodies, single antigen flow beads, interference, IgM, complement

Abbreviations:

B2M: beta-2-microglobulin

DSA: donor specific antibody(ies)

DTT: dithiotreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

mAb(s): monoclonal antibody(ies)

SAFB: single antigen flow beads

SFB: screening flow beads

SPR: surface plasmon resonance

1. Introduction

The release of the single antigen flow beads (SAFB) assays was a major step forward in transplantation. They allow donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) of IgG class to be identified with high resolution and sensitivity [1-6]. Recently, it has been reported that SAFB can underestimate or miss high titer IgG anti-HLA antibodies because of complement activation [7-8]. The mechanism of this interference involves accumulation on bead surface of covalently linked degradation products of C4 and C3 complement factors [9-10]. In routine practice, this interference can be overcome by treating the serum with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT) or 56°C heating for 30 min [7, 8, 10, 11], all having in common the ability to disrupt the complement C1 complex.

The SAFB assay can be modified with an anti-IgM conjugate, allowing IgM anti-HLA antibodies to be detected [12, 13]. IgM were also suspected to interfere with the detection of IgG anti-HLA antibodies as treating serum with DTT, dilution or hypotonic dialysis was able to unmask IgG antibodies, but these approaches were actually not able to distinguish between complement and IgM as the cause for interference [14-16].

In the serum, IgM are predominantly found as large pentameric molecules of high molecular weight. We can therefore wonder whether they could interfere solely because of a direct competition with IgG recognizing the same or sufficiently close HLA epitope(s), of an allosteric effect with IgG recognizing distant epitope(s), or both. In addition, IgM are potent complement activators [17], and as such they could indirectly impair IgG detection by driving complement accumulation on SAFB.

The aim of our study was to precisely decipher the mechanisms of IgM interference for IgG anti-HLA antibody detection with flow beads assays. As a model, we used screening flow beads (SFB) and monoclonal antibodies (mAbs). We then confirmed our findings with SAFB and sera from two patients displaying an interference caused by IgM.

2. Materials and methods

2.1 Reagents, human sera and HLA genotyping

The LABScreen® Mixed Class I and II (LSM12), LABScreen® Single Antigen Class II (LS2A01) and C1q Screen kits were from One Lambda (Canoga Park, CA). The PE-labeled Goat Anti-Human IgG antibody (One Lambda), the PE-labeled Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Mouse IgG (Fc-Gamma specific, Beckman Coulter, Marseille, France) and the PE-labeled Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Mouse IgM (Fc-Mu specific, Beckman Coulter) were used at a saturating 1/100 dilution. The PE-labeled Mouse Anti-Human IgM antibody (Southern Biotech, Birmingham, AL) was used at a saturating 1/6 dilution. The mouse pan class I anti-HLA W6/32 and anti-B2M IgG mAbs were from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL). The mouse anti-human B2M IgM mAb was from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The normal serum was from a healthy male volunteer who had never been transfused nor transplanted. Blood was rapidly centrifuged after sampling, aliquoted and immediately frozen at -80°C. For EDTA-treatment, a 0.1 M solution of disodium EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, MI) at pH 7.4 was diluted 1/10 in the serum and incubated for 10 min before SAFB testing, leading to a 10% serum dilution. For DTT-treatment, a 0.1 M solution of DTT (Sigma-Aldrich) was diluted 1/20 in the serum and incubated for 30 min at 37°C before SAFB testing, leading to a 5% serum dilution. Both treatments therefore led to a 14.5% dilution of the serum. For titration studies, sera were diluted in PBS (Thermo Fisher Scientific). Sera from the two kidney recipients were from our routine serum bank and did not require additional blood sampling. Donors HLA-DQA1 and HLA-DQB1 typing was performed with High Resolution Labtype SSO (One Lambda).

2.2 Anti-HLA antibody assays

The SFB and SAFB assays were performed according to manufacturer's recommendations for routine assay use. MFI values for mAbs are depicted as raw values from all class I HLA beads contained in the SFB assay. For interference assays, IgG and IgM mAbs were mixed together in human sera before incubation with SFB. Experiments were performed in duplicates. Measured MFI values for anti-IgG staining for patients' sera with SAFB were normalized using the baseline formula proposed by the Fusion 3.2[®] software (One Lambda).

2.3 Surface plasmon resonance experiments

SPR experiments were performed at 25°C with a Biacore T200 apparatus (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) on CM5 sensorchips (GE Healthcare). Capture mAbs were immobilized by amine coupling using a mixture of N-hydroxysuccinimide and N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare), after a 20-fold dilution in a sodium acetate buffer (10 mM, pH 5). Then, ethanolamine (1 M, pH 8.5, GE Healthcare) was injected to deactivate the sensor chip surface. Purified HLA-A*02:01, HLA-A*11:01 and HLA-B*44:02 (One Lambda) were injected at adequate dilutions over the capture antibodies for 30 s at 25 µL/min in order to reach 100 to 400 resonance units. The mAbs were prepared in PBS-T running buffer (Sigma-Aldrich) at 10 µg/mL and were sequentially injected at 25 µL/min for 30 s. Surface regeneration was achieved with a 1 min pulse of 10 mM glycine pH 2.1 (GE Healthcare) followed by a 1 min pulse of running buffer. A flow cell left blank was used for referencing of the sensorgrams.

2.4 Statistical analysis

Study of independent variables used the two-tailed Kruskal-Wallis test. Paired quantitative variables were compared using the two-tailed Wilcoxon test. Analyses were performed with MedCalc[®] software (Mariakerke, Belgium).

3. Results

3.1 IgM anti-HLA antibodies can interfere with IgG anti-HLA antibodies detection in SFB assay

The W6/32 and an anti-beta-2-microglobulin (B2M) IgG were used in the SFB assay with neat and EDTA-treated normal serum. We selected mAbs concentrations of 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$, respectively, because they were not high enough for provoking complement interference in neat serum (Figure S1), while providing a fairly strong SFB signal, in the range of 3000 MFI (Figure 1). In neat serum, increasing the anti-B2M IgM concentration led to a progressive decrease of IgG MFI for both mAbs (Figure 1). When comparing IgM binding to SFB in neat and EDTA-treated sera, we confirmed IgM-induced complement interference in neat serum (Figure S2).

3.2 IgM anti-HLA antibodies interfere with detection of IgG anti-HLA antibodies in EDTA-treated serum

The experiments were repeated by diluting the mAbs into EDTA-treated serum, in order to eliminate complement interference. We observed that the IgM mAb induced a concentration-dependent decrease in MFI for both IgG mAbs (Figure 2A), with a stronger effect towards the anti-B2M IgG (Figure 2B). We used surface plasmon resonance (SPR) to analyze whether this difference could be caused by a direct competition for epitope binding occurring only between the anti-B2M mAbs. Three different HLA molecules were captured by one of the IgG mAbs immobilized on the SPR sensor chip, followed by sequential mAbs injections without chip regeneration (Figures 3 and S3). Direct epitope competition was exemplified by the absence of binding of the anti-B2M when injected over HLA molecules captured by the same antibody (Figure 3A). W6/32 but not the anti-B2M IgM could interact with the HLA/anti-B2M IgG complexes. When W6/32 was immobilized on the sensor chip (Figure 3B and 3C), both the anti-B2M IgG (Figure 3B) IgM (Figure 3C) bound to the

HLA/W6/32 complexes. However, the interaction was nearly abrogated for the anti-B2M IgM when it was injected after the IgG (Figure 3B) and for the anti-B2M IgG when it was injected after the IgM (Figure 3C). These results demonstrated that, in flow beads assays, IgM can interfere with IgG independently of complement activation and in a more pronounced manner if they directly compete for the binding to the epitope.

3.3 IgM anti-HLA antibodies interfere with detection of IgG anti-HLA antibodies through complement interference

The comparison of IgG MFI values obtained with neat or EDTA-treated serum for each IgG mAb taken individually allowed a putative indirect effect of IgM through complement interference to be evaluated, as each IgG mAb was used at a concentration unable to activate complement in neat serum. A lower MFI value in neat versus EDTA-treated serum would therefore be attributed solely to IgM-induced complement activation. The residual MFI (%), when compared to the assay performed in the absence of the IgM mAb, was lower in neat serum than in EDTA-treated serum for both mAbs (Figure 4A). Moreover, the complement interference induced by the anti-B2M IgM was more pronounced towards W6/32 than towards the anti-B2M IgG, as indicated by the difference between residual MFI (%) in EDTA-treated and neat sera (Figure 4B).

3.4 Interference of IgM anti-HLA antibodies in patients' sera with SAFB assay

In our routine follow up of kidney transplanted patients, we recently identified 2 anti-HLA non pre-sensitized males (Cases #1 and #2) who received DR11/DQ7-mismatched kidneys from deceased donors. Both had a biopsy for suspicion of an ongoing rejection episode and concomitantly displayed a *de novo* DQ7 DSA in neat serum (Day 63 and 3109 post-transplant for Case #1 and Case #2, respectively). Data are presented in Table 1, for the HLA-DQ7 beads only (beads 1 to 5, with beads 3 to 5 displaying the DQB1/DQA1 allele

pairs most commonly associated with DR11, including the pair displayed by both donors, i.e. HLA-DQA1*05:05; DQB1*03:01). EDTA-treatment of sera strongly increased DSA strength for some beads, demonstrating complement interference for these. However, the serum MFI strength measured in the presence of EDTA (~10,000) remained significantly below the assay MFI upper limit whereas a saturating C1q binding MFI value (>20,000) was observed. We then supposed that coexisting IgG and IgM DQ7 DSA could explain this reactivity pattern and explored this hypothesis.

For Case #1, the Day 63 serum contained a strong IgM targeting beads 3 to 5, and a weaker one against beads 1 and 2 (Table 1, upper part). To assess the ability of these IgM to interfere with IgG detection, the serum was treated with both DTT and EDTA. We observed a 2-fold and a 1.6-fold increase of IgG MFI for beads 3 to 5 and for beads 1 and 2, respectively, confirming the ability of the IgM to interfere with IgG detection in a “dose-dependent” manner. An additional serum, drawn earlier (at day 27 post-transplant) provided identical results (Table S1).

For Case #2, the Day 3109 serum contained an IgM targeting all 5 DQ7 beads (Table 1, lower part). This IgM was very strong as deduced from titration experiments performed with EDTA-treated serum (Table S2). Pre-treating the serum with both DTT and EDTA provided a saturating IgG MFI signal for beads 3 to 5, and an average 7-fold increase for beads 1 and 2. Titration studies were then performed with neat, EDTA-treated and DTT/EDTA-treated sera (Figure 5). Neither neat serum nor EDTA-treated serum dilutions allowed the MFI plateau attained by DTT/EDTA-treatment to be reached. Three additional sera from this patient were analyzed, which were drawn 2.5, 15 and 27 months later (Days 3187, 3558 and 3924) (Figure S4). We documented the persistence of the IgM DSA in these three sera, and still at levels interfering with IgG detection at Days 3187 and 3558.

4. Discussion

We here confirmed that IgM anti-HLA antibodies can interfere with IgG anti-HLA antibodies detection and we report that this phenomenon is concentration-dependent. We also confirmed the ability of IgM to activate complement on flow beads surface, which can lead to an underestimation of IgM anti-HLA antibodies strength, as previously reported for IgG [7-10]. Therefore the previously published studies on IgM might have underestimated the prevalence and pathogenic role of IgM because of this interference [12, 13].

We first identified mechanisms of IgM interference occurring independently of complement activation. We used the experimental model of the class I SFB assay with an anti-B2M IgM mAb and two IgG mAbs diluted in EDTA-treated serum. The anti-B2M IgM interfered with both the anti-B2M IgG and W6/32, but in a more pronounced fashion for the former. Interestingly, SPR experiments showed that the two anti-B2M mAbs competed for antigen binding, but none of them competed with W6/32. This indicated that the two anti-B2M mAbs directly competed for the same epitope or for sufficiently close epitopes. On the contrary, the interference observed for W6/32 was most probably caused by steric hindrance as a direct competition for epitope(s) binding would not be consistent with our discordant findings between both approaches. Indeed, ternary W6/32+HLA+anti-B2M IgM complexes were actually detected with SPR, although only those HLA molecules that were engaged with the immobilized W6/32 mAb remained available for a further interaction with anti-B2M IgM. In contrast, in the SFB assay, the antigen is directly attached to the bead surface and both mAbs are added together. Ways of interactions will therefore be different than in the SPR format, possibly uncovering steric hindrance. This indicated that IgM, when present at a sufficiently high concentration, can interfere by direct competition for epitope with IgG and also by steric hindrance. This interference will obviously depend on the ratio of antibody concentration between IgM and IgG, but also on the ratio of affinity/avidity between both isotypes. Also, availability or exposure of specific epitopes on the beads surface might vary for different antibodies and modulate the degree of inhibition by IgM.

The comparison of IgG MFI obtained with neat or EDTA-treated sera for each monoclonal IgG taken individually allowed evaluating the possibility for IgM to exert an indirect interference through complement activation. Indeed, the IgM-triggered IgG MFI decrease was more substantial in neat than in EDTA-treated serum, demonstrating that IgM can also interfere through complement activation. Interestingly, the MFI decrease was less pronounced for the anti-B2M IgG MFI than for W6/32. This can be explained by the absence of epitope competition between the IgM and W6/32. Indeed, the anti-B2M IgG can only bind the HLA molecules not engaged with the anti-B2M IgM, implicating that the IgG and IgM molecules are distant from each other. On the contrary, W6/32 can bind together with IgM to the same HLA molecule and will be a more accessible target for complement activation products. As a consequence, the anti-B2M IgG should be less affected than W6/32 by complement deposition in the vicinity of the IgM triggers.

Noteworthy, the mAbs used could bind all the class I HLA alleles coated on SFB, thereby mimicking the interaction of patients' sera with SAFB. Indeed, we were able to validate our findings with patients' sera in the SAFB setting. The competition/steric IgM interference is specifically illustrated with Case #1 on beads 1 and 2. Indeed, these beads had low IgG and IgM MFI in neat serum, and IgG MFI was not modified by EDTA, ruling out a complement interference caused by IgG or IgM, whereas IgG MFI increased when DTT was added. Besides, beads 3 to 5 displayed IgM interference through complement activation. Indeed, IgG MFI increased by nearly 3-fold with EDTA-treatment, whereas results from DTT/EDTA-treatment indicated that such a low IgG strength should not trigger a massive complement activation and then interference.

For Case #2, beads 1 and 2 behaved exactly as those from Case #1. This looked intriguing as IgM MFI were very high and as such should have induced stronger C1q binding and complement interference. An explanation could be that competition between IgM at saturating levels would decrease the number of paratopes engaged with antigen molecules for

any given IgM pentamer, limiting the conformational change that permits C1q binding and therefore complement activation. On the other hand, IgG MFI for beads 3 to 5 of Case #2 were very high and did not allow distinguishing complement interference due to IgG or to IgM. Nevertheless, these results indicated that a very strong IgM can interfere with the detection of IgG even when IgG is also very strong. Moreover, our study demonstrated that titration of neat serum did not allow IgM interference to be prevented, questioning the recent proposal that it would represent the most accurate way to assess IgG HLA antibody strength [18]. Testing subsequent sera from Case #2 as far as 28 months after detection of the IgM and IgG anti-HLA sensitization also showed that strong IgM can persist and still interfere with IgG detection for at least 2 years.

To conclude, IgM anti-HLA antibodies can interfere with IgG anti-HLA antibodies detection in flow beads assays through competition, steric hindrance and complement interference. Additional parameters should therefore be taken into account for a clear understanding of HLA antigen/antibody interaction and interpretation of the MFI measured with the IgG flow beads assays. Indeed, serum anti-HLA antibodies are not epitope monospecific in most cases, and may combine antibodies of at least the IgG and IgM isotypes. Further studies are required to assess the prevalence of IgM anti-HLA antibodies, and then the impact of the interference they induce before recommending a systematic pre-treatment of sera with DTT instead of other methods.

5. Acknowledgments

We thank the structural biophysico-chemistry facility (UMS 3033/US001) of the Institut Européen de Chimie et Biologie (Pessac, France) for access to the Biacore T200 instrument that was acquired with the support of the Conseil Régional d'Aquitaine, the GIS-IBiSA, and the Cellule Hôtels à Projets of the CNRS. This work has benefited from an unrestricted grant given by Astellas Pharma, France. The funders had no role in work design and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

6. Author contributions

J.T., J.V. and G.G. contributed to the design of the study. J.T. and J.V. participated in the writing of the paper. J.V., C.D. and J.T. participated in the performance of the research. J.V., C.D. and J.T. participated in data analysis. J.L., L.C. and P.M. were involved in critical revision of the manuscript.

7. References

- [1] Dunn TB, Noreen H, Gillingham K et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 2011; 11: 2132-43.
- [2] Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 1398-406.
- [3] Couzi L, Araujo C, Guidicelli G et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91: 527-35.
- [4] Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am. J. Transplant.* 2012; 12: 1157-67.
- [5] Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am. J. Transplant.* 2009; 9: 2532-41.
- [6] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009; 87: 1505-13.
- [7] Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D et al. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92: 510-5.
- [8] Guidicelli G, Anies G, Bachelet T et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl. Immunol.* 2013; 29: 17-21.
- [9] Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, Eskandary F, Bohmig GA. Complement Component C3 Activation: The Leading Cause of the Prozone Phenomenon Affecting HLA Antibody Detection on Single-Antigen Beads. *Transplantation* 2014; 97: 1279-85.

- [10] Visentin J, Vigata M, Daburon S et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation* 2014; 98: 625-31.
- [11] Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int. J. Immunogenet.* 2013; 40: 171-7.
- [12] Stastny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 600-4.
- [13] Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation* 2014; 97: 494-501.
- [14] Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 496-501.
- [15] Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, Chaudhry AN, Taylor CJ. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009; 87: 813-20.
- [16] Kosmoliaptsis V, O'Rourke C, Bradley JA, Taylor CJ. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum. Immunol.* 2010; 71: 45-9.
- [17] Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2010. 125: S41-52.
- [18] Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am. J. Transplant.* 2015; In Press. doi: 10.1111/ajt.13295

Table 1: Study of IgM interference in SAFB assay with sera from two patients. Detailed report of baseline MFI values obtained with IgG, IgM and C1q assays on class II SAFB after the indicated treatment of the serum from two patients displaying HLA-DQ7 DSA. Only the five DQB1*03:01 (DQ7 serological equivalent) beads are depicted. DSA: donor specific antibodies, SAFB: single antigen flow beads.

Case #1			Bead staining			IgG		C1q	IgM	
			Serum treatment			Neat	EDTA	DTT EDTA	Heat	EDTA DTT EDTA
Bead	DQB1 allele	DQA1 allele								
1	DQB1*0301	DQA1*0201	4057	3480	6066	1474	2881	96		
2	DQB1*0301	DQA1*0301	3540	3041	4660	2538	2343	66		
3	DQB1*0301	DQA1*0601	1958	7721	15869	21097	8001	270		
4	DQB1*0301	DQA1*0503	2423	7205	14802	21996	7896	255		
5	DQB1*0301	DQA1*0505	3449	6370	12141	22497	6227	203		

Case #2			Bead staining			IgG		C1q	IgM	
			Serum treatment			Neat	EDTA	DTT EDTA	Heat	EDTA DTT EDTA
Bead	DQB1 allele	DQA1 allele								
1	DQB1*0301	DQA1*0201	1560	1132	10176	853	13261	3866		
2	DQB1*0301	DQA1*0301	1680	1289	6791	1285	13295	3782		
3	DQB1*0301	DQA1*0601	815	15292	20727	25751	14340	5205		
4	DQB1*0301	DQA1*0503	6679	14686	20802	26239	14680	5221		
5	DQB1*0301	DQA1*0505	2587	11443	19470	24450	13965	5654		

Figures legends

Figure 1: Interference of IgM anti-HLA antibodies with detection of IgG anti-HLA antibodies in SFB. SFB were incubated with an anti-B2M IgG (2 µg/mL, left panel) or with W6/32 (1 µg/mL, right panel) mAbs in neat serum and with increasing concentrations of an anti-B2M IgM, and then IgG binding was revealed. The boxes depict the median, and the first and third quartiles of raw MFI values from all 12 beads displaying class I HLA molecules pooled from 2 independent experiments. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. MFI were compared using the Kruskal-Wallis test. B2M: beta-2-microglobulin, mAb(s): monoclonal antibody(ies), SFB: screening flow beads.

Figure 2: IgM anti-HLA antibodies interfere with IgG anti-HLA antibodies detection in EDTA-treated serum. Figure 2A: SFB were incubated with an anti-B2M IgG (2 µg/mL, left panel) or with W6/32 (1 µg/mL, right panel) mAbs in EDTA-treated serum and with increasing concentrations of an anti-B2M IgM, and then IgG binding was revealed. Experiments were performed in duplicate. The boxes depict the median, and the first and third quartiles of raw MFI values from all 12 beads displaying class I HLA molecules pooled from 2 independent experiments. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. MFI were compared using the Kruskal-Wallis test. Figure 2B depicts the anti-B2M IgG and W6/32 residual MFI (% , mean +/- 1SD) in EDTA-treated serum, compared using the paired Wilcoxon test. B2M: beta-2-microglobulin, SFB: screening flow beads. B2M: beta-2-microglobulin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, mAb(s): monoclonal antibody(ies), SFB: screening flow beads.

Figure 3: SPR analysis of competition between mAbs. Anti-B2M IgG (Figure 3A) or W6/32 (Figure 3B and 3C) mAbs were immobilized on a CM5 sensorchip to capture any of three different class I HLA molecules HLA-A*02:01 (black bars), A*11:01 (grey bars) and B*44:02 (white bars). Figure 3A depicts the specific binding (resonance units) to HLA captured by the anti-B2M IgG of the sequentially injected (i.e. without regeneration between them) anti-B2M IgG, anti-B2M IgM and W6/32. Figure 3B depicts the specific binding (response units) to HLA captured by the W6/32 of the sequentially injected anti-B2M IgG (sum of response units from two successive injections) and anti-B2M IgM. Figure 3C depicts the specific binding (response units) to HLA captured by the W6/32 of the sequentially injected anti-B2M IgM (sum of response units from two successive injections) and anti-B2M IgG. Arrows underline the sequential character of the injections. All mAbs were injected for 30 s at 10 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{L/min}$. Experiments were performed one time. B2M: beta-2-microglobulin, mAb(s): monoclonal antibody(ies), SPR: surface plasmon resonance.

Figure 4: IgM anti-HLA antibodies interfere with IgG anti-HLA antibodies detection through complement interference. SFB were incubated with an anti-B2M IgG (2 $\mu\text{g/mL}$) or W6/32 (1 $\mu\text{g/mL}$) in neat or EDTA-treated serum in the presence of increasing concentrations of an anti-B2M IgM, and then IgG binding was revealed. Figure 4A depicts the comparison of anti-B2M IgG (left panel) and W6/32 (right panel) residual MFI (% , mean \pm 1SD) with the paired Wilcoxon test for raw MFI values from all from all 12 beads displaying class I HLA molecules pooled from 2 independent experiments. Figure 4B depicts the difference between residual MFI (% , mean \pm 1SD) obtained with EDTA-treated and neat sera for anti-B2M IgG and W6/32 (paired Wilcoxon test). B2M: beta-2-microglobulin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, mAb(s): monoclonal antibody(ies), SFB: screening flow beads.

Figure 5: Titration of Day 3109 serum from Case #2. Day 3109 serum from Case #2 was analyzed in neat, EDTA-treated and DTT/EDTA-treated conditions at different dilutions in PBS. Figure depicts baseline MFI values obtained with IgG assay on SAFB and for the five beads displaying the DQB1*03:01 allele (DQ7 serological equivalent). Means of MFI from beads 1 and 2 are represented in the left panel, means \pm standard deviation of beads 3 to 5 are represented in the right panel. Experiments were performed one time. SAFB: single antigen flow beads. DTT: dithiotreitol, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SAFB: single antigen flow beads.

Supplementary material captions

Table S1: Study of IgM interference in SAFB assay with Day 27 serum from Case #1.

Detailed report of baseline MFI values obtained with IgG and IgM assays on class II SAFB after the indicated treatment of the Day 27 serum from Case #1. Only the five DQB1*03:01 (DQ7 serological equivalent) beads are depicted. DTT: dithiotreitol, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SAFB: single antigen flow beads.

Table S2: IgM titration on SAFB with Day 3109 serum from Case #2.

Detailed report of baseline MFI values obtained with IgM assay on SAFB after EDTA-treatment of day 3109 sera from Case #1. Only the five DQB1*03:01 (DQ7 serological equivalent) beads are depicted. SAFB: single antigen flow beads.

Figure S1: Selection of W6/32 and anti-B2M IgG concentrations not inducing a

complement interference phenomenon with SFB assay. W6/32 and anti-B2M IgG were used at different concentrations in EDTA-treated or neat serum, and then IgG and C3-binding were evaluated using the SFB assay. Mouse biotinylated anti-C3d Mab (Quidel, San Diego, CA) and PE-labeled Streptavidin (Beckman Coulter) were used at 1/100 and 1/200 dilutions respectively. B2M: beta-2-microglobulin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SFB: screening flow beads.

Figure S2: IgM detection with SFB is subject to complement interference.

Anti-B2M IgM was used at different concentrations in EDTA-treated or neat serum, and then IgM-binding MFI was evaluated. B2M: beta-2-microglobulin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SFB: screening flow beads.

Figure S3: Competition analysis by surface plasmon resonance. Sensorgrams showing the capture of HLA-A*02:01 molecules by anti-B2M IgG (upper panel) or W6/32 (middle and bottom panels), followed by sequential mAbs injections (10 µg/mL) without chip regeneration. After HLA capture by W6/32, anti-B2M IgG (middle panel) and IgM (bottom panel) were injected twice in order to ascertain HLA molecules saturation. Similar sensorgrams were obtained with HLA-A*11:01 and B*44:02 (not shown). B2M: beta-2-microglobulin, mAb(s): monoclonal antibody(ies).

Figure S4: Study of IgM interference in SAFB with Days 3187, 3558 and 3924 sera from Case #2, in comparison with Day 3109 serum. Day 3187, 3558 and 3924 sera from Case #2 were analyzed in EDTA-treated (IgM and IgG) and DTT/EDTA-treated (IgG) conditions, and compared with Day 3109 serum. Figure depicts baseline MFI values obtained with the IgG assay on SAFB for the five beads displaying the DQB1*03:01 allele (DQ7 serological equivalent). Means of MFI from beads 1 and 2 are represented in the left panel, means +/- SD of beads 3 to 5 are represented in the right panel. DTT: dithiotreitol, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SAFB: single antigen flow beads.

Figure 1

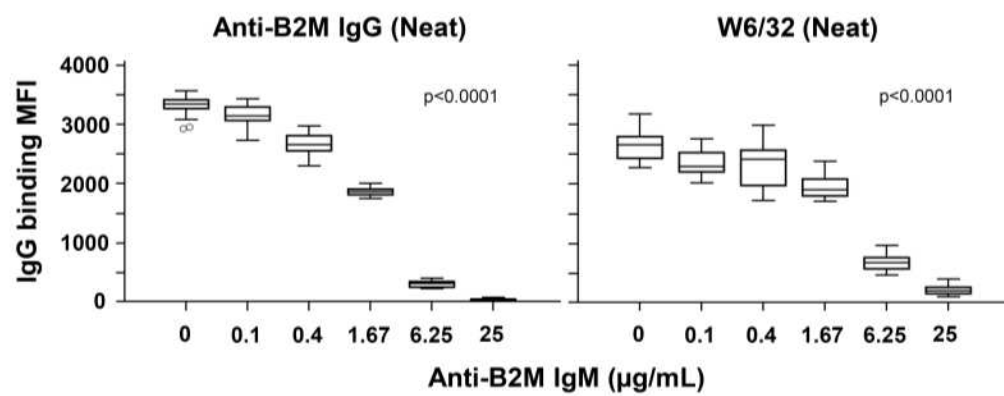
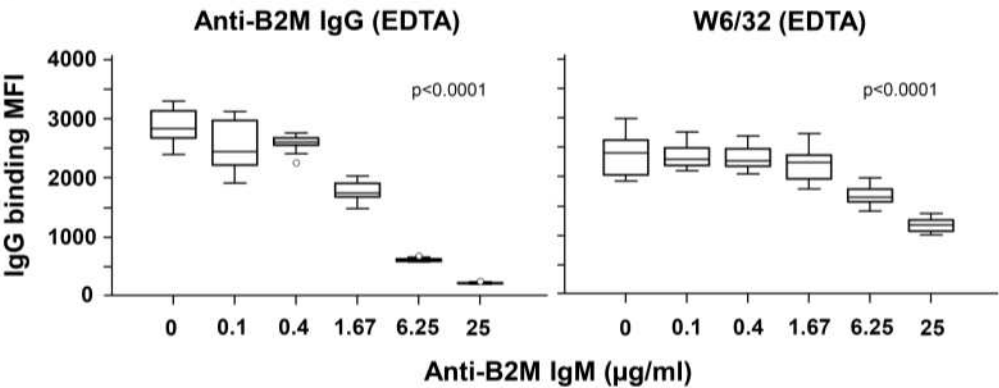


Figure 2

A



B

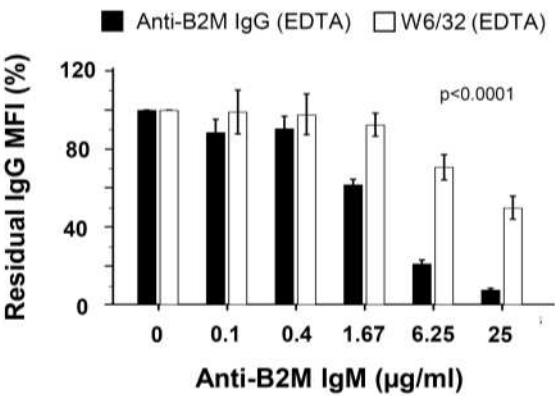


Figure 3

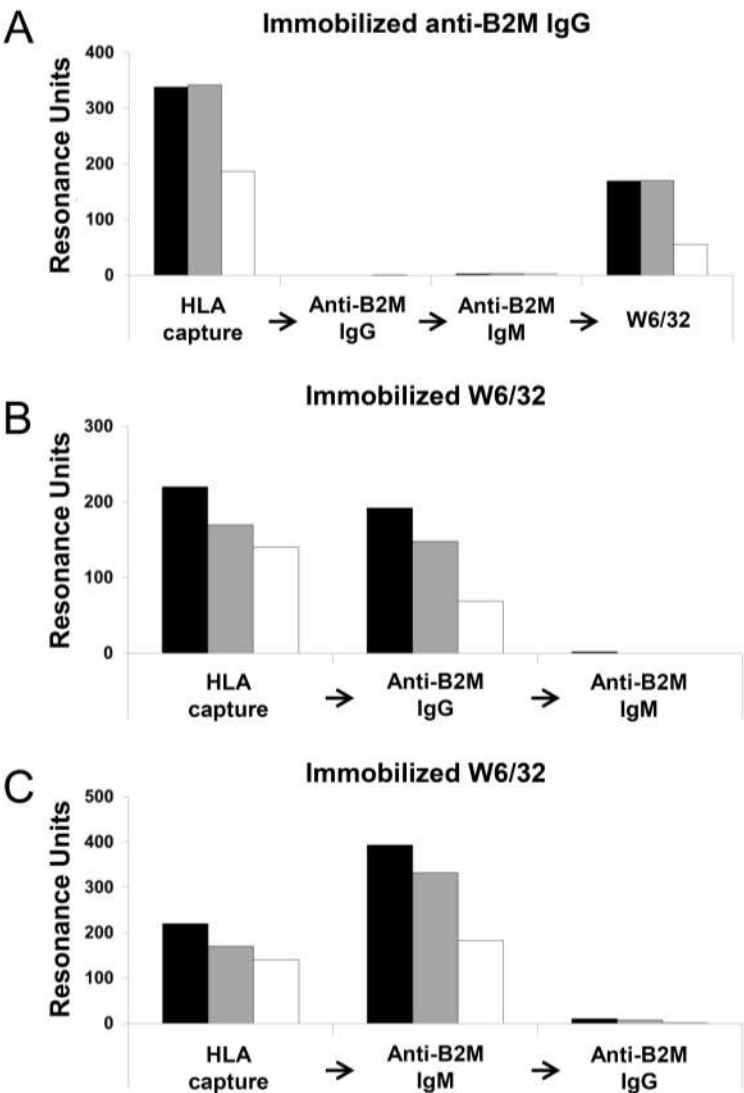
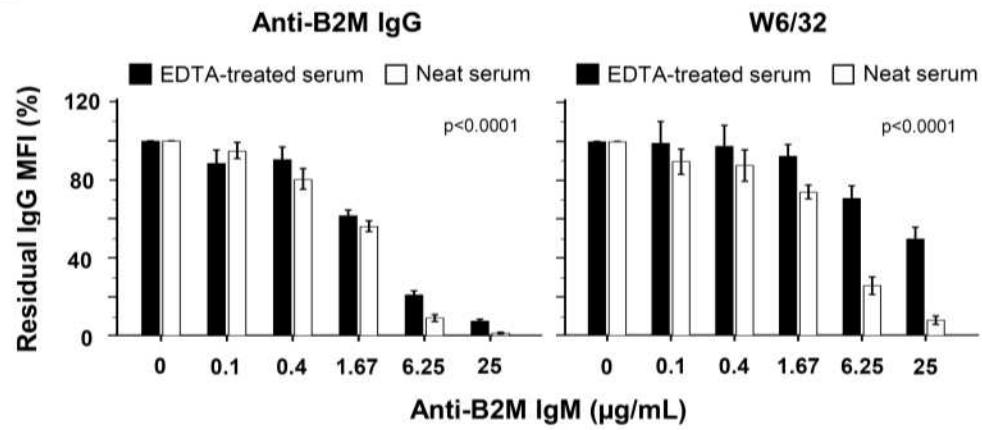


Figure 4

A



B

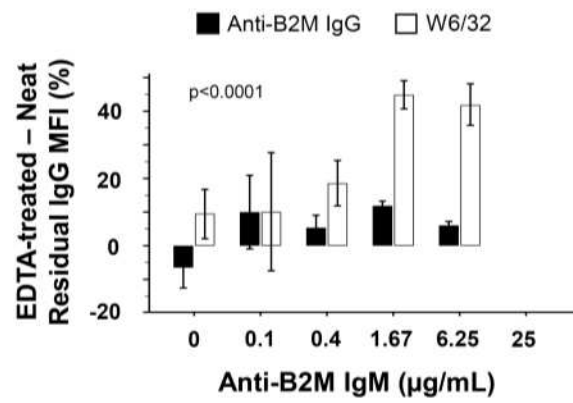


Figure 5

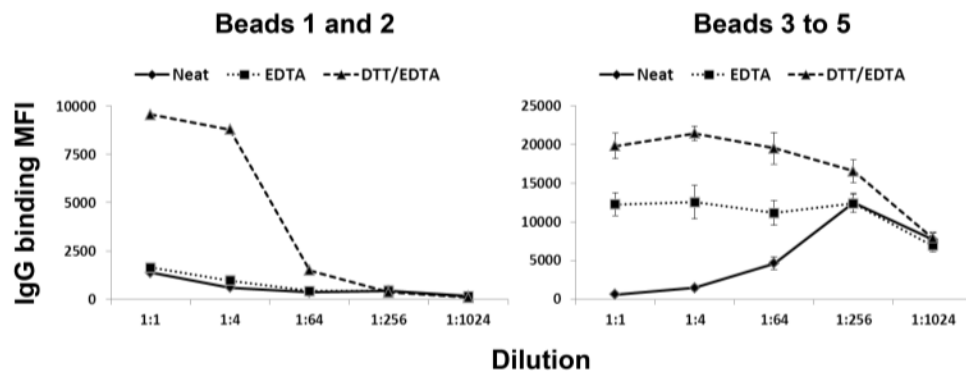


Table S1. Study of IgM interference in SAFB assay with Day 27 serum from Case #1.

Case #1		Bead staining		IgM		IgG	
		Serum treatment		EDTA	EDTA	DTT EDTA	
Bead	DQB1 allele	DQA1 allele					
1	DQB1*0301	DQA1*0201	1604	2714	4292		
2	DQB1*0301	DQA1*0301	734	1975	3244		
3	DQB1*0301	DQA1*0601	6331	7909	13788		
4	DQB1*0301	DQA1*0503	6665	7758	12756		
5	DQB1*0301	DQA1*0505	4602	5848	10461		

Table S2. IgM titration on SAFB with Day 3109 serum from Case #2.

Case #2			IgM MFI				
Dilution range			1:1	1:4	1:64	1:256	1:1024
Bead	DQB1 allele	DQA1 allele					
1	DQB1*0301	DQA1*0201	13261	13589	10869	5068	1546
2	DQB1*0301	DQA1*0301	13295	13510	10845	5630	1573
3	DQB1*0301	DQA1*0601	14340	14360	12162	9348	4072
4	DQB1*0301	DQA1*0503	14680	14661	12231	9210	4320
5	DQB1*0301	DQA1*0505	13965	13596	11632	7966	3471

Figure S1

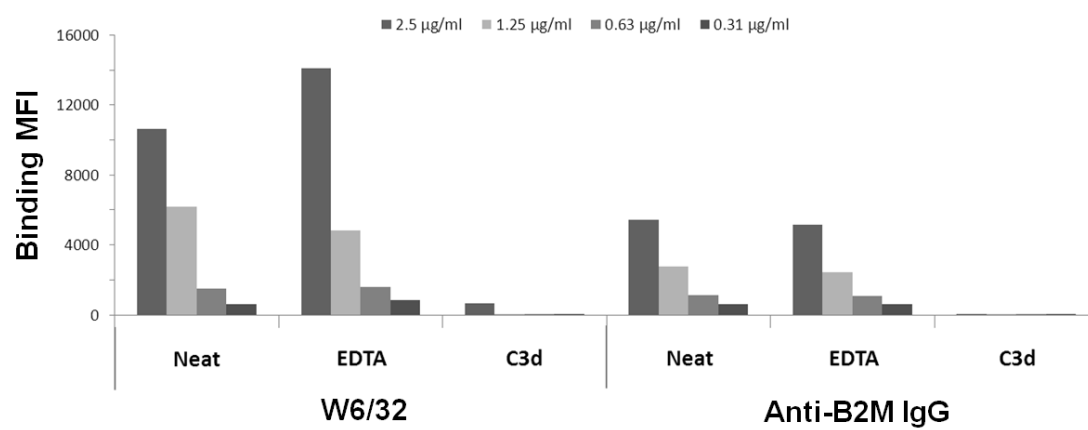


Figure S2

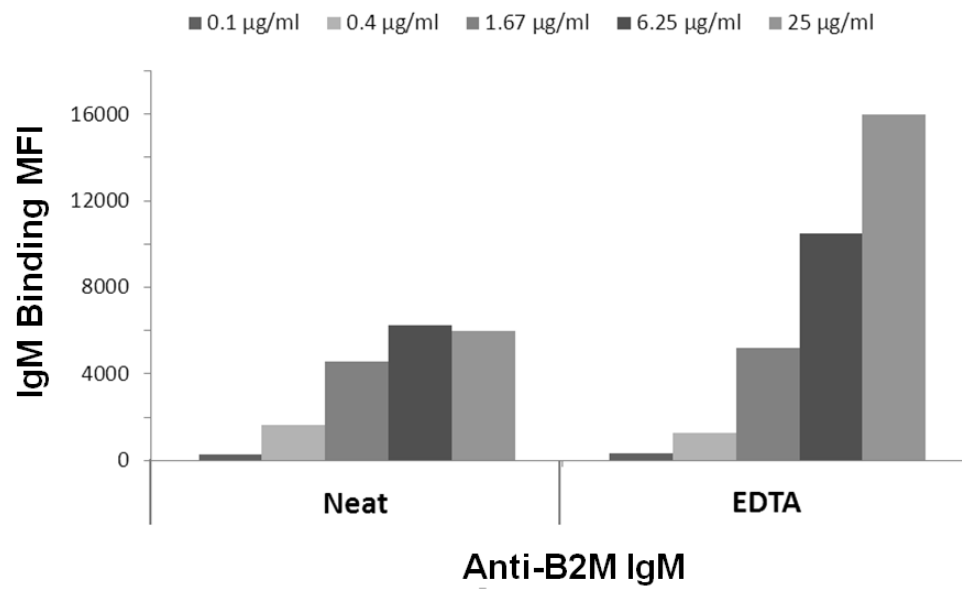


Figure S3

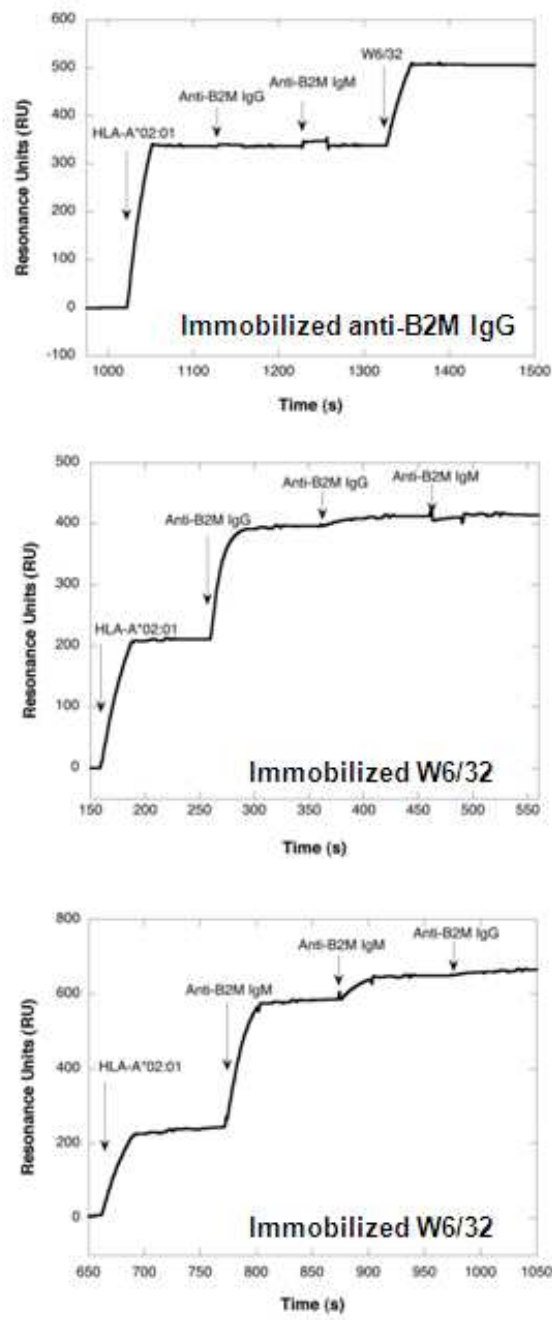
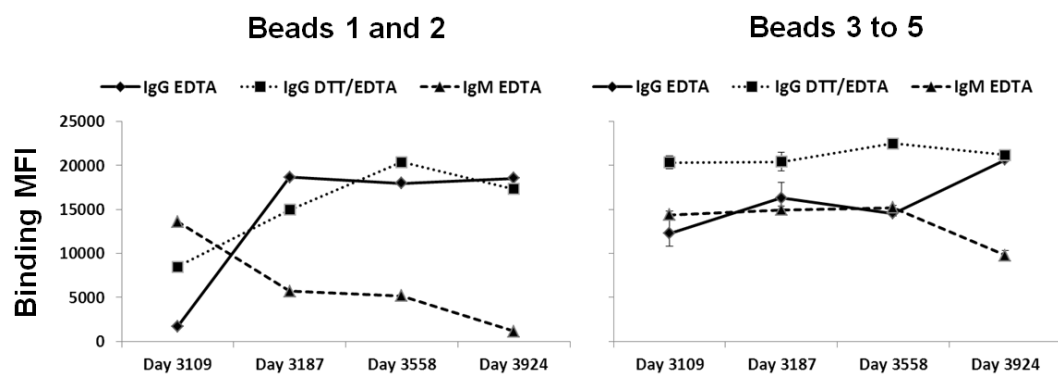


Figure S4



VII-3 – Interférences négatives - Discussion des résultats

Notre travail sur l'interférence liée au complément a permis de mieux comprendre le mécanisme des sous-estimations ou fausses négativités des IgG anti-HLA de forte MFI, et constitue actuellement la description la plus précise de ce phénomène dans la littérature. En effet, au moment même où nous soumettions notre travail pour publication, une équipe autrichienne montrait que l'activation du complément jusqu'au facteur C3, et non le complexe C1 seul, était nécessaire pour observer l'interférence (375). Néanmoins, l'approche utilisée ne permettait pas de discriminer les rôles respectifs du C3 et du C4, ni celui de la voie alterne, contrairement à notre stratégie.

Ce mécanisme est également mis en jeu lors de l'interférence des IgM anti-HLA pour la détection des IgG anti-HLA. Ce point est intéressant dans le sens où le traitement EDTA, qui ne permet pas de détruire les IgM, permet de compenser une partie de l'interférence liée aux IgM et pourrait donc éviter la non-détection d'IgG anti-HLA dans ce contexte, sans avoir recours au traitement du sérum par le DTT. En effet, selon notre expérience, le traitement du sérum au DTT est plus difficile à maîtriser que le traitement EDTA à cause de l'inconstance de la correction de l'interférence liée au complément, de l'apparition d'un bruit de fond parfois très élevé qui empêche la détection des anticorps faiblement positifs, et du temps nécessaire pour la réalisation de cette étape en pratique de routine. De plus, la prévalence de l'interférence liée aux IgM reste à évaluer et pourrait être beaucoup moins fréquente que l'interférence liée au complément. En revanche, nos résultats indiquent que le moyen le plus sûr d'obtenir la MFI la plus juste serait d'utiliser le traitement décrit dans le sixième article, c'est-à-dire DTT+EDTA.

Il est important de noter que comme de nombreuses autres équipes, nous avons clairement établi un lien direct entre la MFI en SAG classique et la capacité d'un anticorps anti-HLA à fixer puis activer le complément à la surface des billes (161, 336). Ainsi, la détection de DSA fixant/activant le complément pourrait n'être qu'une question de moindre sensibilité de ces tests, les rendant a priori inutiles à partir du moment où la juste MFI est obtenue grâce à un prétraitement adéquat des sérums. D'autres facteurs pourraient également être impliqués, tels que la densité et l'organisation des molécules HLA à la surface de billes.

Nous avons évoqué dans la partie introductive que plusieurs équipes ont étudié la fixation du C4d sur les billes SAG (224, 362). Certains auteurs décrivaient que le marquage C4d était généralement plus faible que le marquage C1q (171), contrairement à ce que nous avons observé. Ceci doit être imputé à une interférence liée aux dépôts de C3 pour la détection du C4d. En effet, le protocole utilisé pour la détection de la fixation du C1q incluait une étape de traitement à la chaleur (56°C 30 minutes) du sérum, empêchant l'initiation de la voie classique du complément, alors que le protocole utilisé proposé pour la détection du C4d utilisait du sérum « brut ». Une correction de la MFI C4d pourrait être obtenue en utilisant un prétraitement des sérums à l'EDTA et en ajoutant, après lavage des billes, une incubation avec du sérum déplété en fraction C3 du complément.

Enfin, le C1q semble plus difficilement maintenu à la surface des billes que le C4d ou le C3d qui se lient de manière covalente et donc seront stables. Nous pourrions donc nous attendre à une sensibilité supérieure d'un test mesurant le dépôt de C4d ou C3d en comparaison à un autre mesurant la fixation du C1q. De plus, la sensibilité du test C3d devrait être supérieure à celle du test C4d, la production de C3b étant amplifiée par le fait qu'une C3 convertase classique clive plusieurs molécules C3, et que la production de C3b est amplifiée par la voie alterne.

VIII – Troisième partie : Interaction des anticorps anti-HLA avec le greffon

VIII-1 – Septième article : La présence de DSA intra-greffon est un facteur de risque de perte du greffon en transplantation pulmonaire

Article soumis dans la revue *Journal of Heart and Lung Transplantation* actuellement en cours de révision

« Lung intragraft donor-specific antibodies as a risk factor of graft loss »

Jonathan Visentin, Albane Chartier, Layal Massara, Gabriel Linares, Gwendaline Guidicelli, Elodie Blanchard, Marie Parrens, Hugues Begueret, Claire Dromer and Jean-Luc Taupin

Présentation et objectifs du travail

Nous avons brièvement évoqué dans la partie introductive de ce mémoire qu'il était possible d'utiliser le SAG afin de détecter les DSA présents dans le greffon, après élution de ceux-ci, en transplantation rénale et hépatique (236, 370). Nous avons appliqué cette même approche à une cohorte de transplantés pulmonaires car nous pensions alors que la détection des DSA *in situ* pouvait être un marqueur pronostique particulièrement intéressant dans cette indication, les critères diagnostiques histologiques de rejet humoral étant bien moins clairement définis qu'en transplantation rénale.

Mon rôle dans cette étude a consisté en la réalisation d'une partie des éluations des DSA à partir des biopsies, auxquelles Layal Massara et Gabriel Linares (Master 2 recherche et Master 1 recherche, respectivement, à cette époque, sous la direction du Pr Taupin), et le Pr Jean-Luc Taupin ont également participé, puis en l'analyse des résultats obtenus et leur mise en relation avec les données cliniques, collectées par les Dr Albane Chartier et Claire Dromer, et histologiques, collectées par le Dr Hugues Begueret, puis en la rédaction de l'article. Ce sujet a également tenu lieu de Thèse de Docteur en Médecine pour le Dr Albane Chartier.

Nous avons inclus dans cette étude 53 patients transplantés pulmonaires pour lesquels un fragment biopsique congelé non fixé était disponible au laboratoire d'anatomopathologie, avec un sérum concomitant disponible dans la sérothèque du laboratoire d'immunologie et immunogénétique hospitalier. La plupart de ces biopsies étaient des biopsies sur indication (Table 2). Parmi ces patients, 25/53 (47,2%) ne présentaient pas de DSA dans leur sérum au moment de la biopsie. Parmi les 28/53 (52,8%) patients présentant des DSA dans le sérum (sDSA), 11/53 (20,8%) présentaient au moins un DSA dans l'éluat de leur biopsie (gDSA). L'analyse des données démographiques ne mettait pas en évidence de différences entre les patients avec ou sans DSA au moment de la transplantation (Table 1). Au moment de la biopsie, les patients sans gDSA avaient significativement plus de biopsies normales (Table 2). La fonction du greffon était identique entre les patients avec et sans gDSA (Table 3). Les patients avec gDSA avaient plus fréquemment reçu un traitement pour le rejet humoral après la biopsie (Table 5). Concernant les caractéristiques des gDSA, seulement l'un d'entre eux n'était pas détectable dans le sérum, leur MFI dans le sérum était significativement supérieure en comparaison à ceux non retrouvés dans les éluats de biopsies et la taille des fragments biopsiques à partir desquels les gDSA étaient retrouvés étaient en général plus volumineux (Figure 1). La survie du greffon globale et à 1 an post-biopsie était inférieure pour les patients ayant des gDSA (Figure 2, Tables 4 et 6), en analyses univariées et multivariées.

**Title: LUNG INTRAGRAFT DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES AS A RISK FACTOR
FOR GRAFT LOSS**

Authors: Jonathan VISENTIN^{1,2}, Albane CHARTIER³, Loyal MASSARA², Gabriel LINARES¹, Gwendaline GUIDICELLI¹, Elodie BLANCHARD³, Marie PARRENS^{4,5}, Hugues BEGUERET⁴, Claire DROMER³ and Jean-Luc TAUPIN^{1,2}.

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France ; ²UMR CNRS 5164, Université de Bordeaux, Talence, France ; ³Service des Maladies Respiratoires, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France ; ⁴Laboratoire de Biologie et Pathologie des Tumeurs, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France ; ⁵E2406, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Keywords: HLA antibodies, lung transplant, single antigen flow beads, biopsy, antibody-mediated rejection

Address for correspondence (present address):

Pr Jean-Luc TAUPIN, Pharm. D., Ph.D.

Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis

1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France

Tel +33 1-42-49-49-35 / Fax +33 1-42-49-52-47

Email jean-luc.taupin@aphp.fr

Abstract

Background: In lung transplantation, the impact of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) on graft survival is admitted, but not all serum DSA are harmful. We sought to determine if *in situ* detection of DSA from graft biopsies could help identifying lung transplant recipients (LTRs) at higher risk of graft loss.

Methods: Biopsies and sera from 53 LTRs were collected and we applied the class I and II anti-HLA single antigen flow bead assays to both biopsy eluates and sera. Intragraft antibodies (gDSA) were correlated to serum DSA (sDSA), to clinical and histological data and to graft survival.

Results: Twenty-eight (52.8%) LTRs had sDSA and 11 (20.8%) had gDSA. Fifty sDSA were found, among which 14 (28%) were also found in biopsy eluates. One DSA was detected in the biopsy only. Both serum MFI and size of biopsy fragment were higher for sDSA detected in biopsies ($p = 0.003$ and 0.02 , respectively). LTRs having gDSA displayed a lower one-year post-biopsy graft survival (log-rank test $p=0.008$). Presence of gDSA at time of biopsy constituted a risk factor for graft loss in univariate (OR 6.67 [1.51-29.47], $p=0.008$ and HR 3.44 [1.47-8.01], $p=0.005$) and multivariate analyses (OR 5.85 [1.23-27.68], $p=0.03$ and HR 4.51 [1.83-11.13], $p=0.001$) using logistic regression and a Cox proportional hazard model, respectively.

Conclusions: In lung transplantation, intragraft DSA appears as a valuable biomarker to identify pathogenic DSA and recipients at higher risk of graft loss.

Introduction

In the last decades, lung transplantation (LT) has benefited from advances in surgical techniques and development of immunosuppressive drugs, but median survival remains limited in comparison with other solid organ transplantations.¹ The most frequent cause of graft loss is the bronchiolitis obliterans syndrome (BOS),^{1, 2} which is associated with different risk factors: acute cellular rejection, lymphocytic bronchitis, human leukocyte antigen (HLA) mismatches, community-acquired respiratory viral infections, primary graft dysfunction and gastroesophageal reflux.³⁻⁶ Earlier studies have shown that development of HLA antibodies was also associated with BOS and even preceded its development.⁷⁻¹⁰ This was emphasized in the recent literature thanks to the single antigen flow beads assays (SAFB) which have greatly improved the resolution and the sensitivity of donor-specific antibodies (DSA) detection.¹¹⁻¹⁶ However, detection of serum DSA with SAFB is not devoid of technical limitations such as the false-negative results caused by the complement interference phenomenon,¹⁷⁻¹⁹ and the false-positive reactions due to the detection of anti-denatured class I HLA antibodies, whose pathogenic role is uncertain.²⁰⁻²⁵ It is well admitted that presence of DSA is not synonymous to lung allograft injury.²⁶ Among the advanced hypotheses is the incapacity of the DSA to bind to the graft, because of the absence of expression of cognate HLA molecules or because of insufficient binding strength between a low affinity DSA and its target. On the contrary, it has been suggested in kidney^{27, 28} and liver²⁹ transplantation that DSA may not be detectable within the blood during episodes of antibody mediated rejection (AMR), if the DSA is completely trapped within the allograft. Another difficulty is that the histological features of AMR in LT have not been accurately defined yet, leading to frequently consider the presence of serum DSA concomitantly with biopsy anomalies as AMR, without clear evidence of a pathogenic interaction between the DSA and the transplant.³⁰ In a previous work, we reported in kidney transplantation that *in situ* detection of DSA was a severity marker for antibody-mediated pathogenic processes.³¹ The aims of this study were therefore to firstly evaluate

whether intragraft DSA (gDSA) can be detected in lung transplant biopsies, secondly to identify the factors associated with their presence and finally whether they could represent a risk factor for graft loss.

Methods

Patients and biopsies

This was a retrospective monocentric study. Among the 252 LT recipients (LTRs) transplanted in our centre from January 1999 to July 2014, we included the 53 LTRs for whom a frozen non fixed transbronchial or surgical biopsy and a serum sample drawn close to the day of biopsy were still available. According to the local practice, biopsies were performed either for deterioration in clinical status or for routine surveillance. Formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens were stained with hematoxylin-eosin for histologic review and classification according to the ISHLT 2007 report.³² Available data on HLA sensitization status, graft conditions, immunosuppressive regimen and graft functional status at 12 months post-biopsy and until August 2015 were collected. LTRs death, re-inscription on the waiting list or re-transplantation defined a graft loss. The study was approved by the institutional review board and did not interfere with standard patient clinical management. Except for cystic fibrosis patients, LTRs received an induction therapy with anti-thymocyte globulins, and the maintenance therapy associated ciclosporin or azathioprine, mycophenolate and steroids. Tacrolimus replaced ciclosporin in case of BOS or refractory acute rejection. Everolimus was associated to standard therapy in second intention, in case of kidney dysfunction or BOS. Azithromycin was introduced in case of BOS with airway neutrophilia without infectious manifestations.

Biopsy elution and anti-HLA antibody testing

Before processing the graft biopsies according to the previously described protocol³¹⁻³³ using the Acid Elution kit (Elukit II; Gamma Biologicals, Inc., Houston, TX), their length, width and thickness were measured in order to determine their size. Remnants from biopsies devoted to histopathological analysis were used. No sampling was performed for the purpose of the study. Anti-HLA Class I and II antibodies were identified in the serum

and the biopsy eluates with the LabScreen LS1A04 and LS2A01 SAFB assay (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) on a Luminex 100[®] analyzer (Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations. All the sera were treated with ethylenediamine tetraacetic acid in order to circumvent the complement interference phenomenon.¹⁷⁻¹⁹ When necessary, additional donor HLA typing (Class I HLA-A, -B, -Cw loci and Class II HLA-DR, -DR51/52/53, -DQ and -DP loci) was performed on cell aliquots stored frozen at the time of the transplant by using the high-resolution reverse SSO-PCR assay (LabType, One Lambda, Inc.). For the serum DSA (sDSA), the positivity threshold was set at a normalized mean fluorescence intensity (MFI) of 500 using the baseline calculation mode (HLA Fusion software; One Lambda, Inc.). For the biopsy eluates, the positivity threshold was set at a normalized MFI higher than mean plus 5 standard deviations of MFI for alleles not displayed by the donor and not recognized by a serum antibody.

Statistical analysis

Analyses were performed using conventional statistical methods. Categorical and continuous variables were summarized as percentage and median values with range or interquartile range (IQR). The independent-samples non-parametric Mann–Whitney U-test and the Fisher's exact test were used for group comparisons of continuous and categorical variables, respectively. Optimal threshold for MFI value was determined with receiver operating characteristics (ROC) analysis. Kaplan–Meier analysis was used to construct graft survival curves. Comparisons were made using the log-rank test. The variables potentially associated with one-year post-biopsy survival were subjected to univariate and multivariate analysis, using a logistic regression model. Model calibration was evaluated using the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test. A Cox proportional hazards analysis was used for univariable and multivariable analyses for graft survival. Variables included in multivariate analyses were those that showed trends in univariate analysis, i.e. $p \leq 0.2$. Variables found not

to be independently predictive of graft survival were dropped using the backward elimination procedure. Results are reported as odds ratios (ORs) with a 95% confidence interval (CI) and corresponding p-value. P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed with MedCalc software (Mariakerke, Belgium).

Results

Patients' characteristics at transplantation and at biopsy

The study included 53 LTRs for whom serum and biopsy eluates were tested with both class I and II SAFB. From serum analysis, 4 LTRs were not sensitized and 49 LTRs (92.5%) exhibited anti-HLA Class I and/or II antibodies. Among them, 6 (11.3%) only exhibited class I antibodies, 9 (17.0%) only exhibited class II antibodies and 34 (64.2%) exhibited both. No sDSA was found in 25 LTRs, and at least one sDSA was present in 28 LTRs (52.8%), 6 (21.4%) displaying only class I DSA, 18 (64.3%) only class II DSA and 4 (14.3%) both DSA types, with a median sDSA number of 2 (range 1 – 4) per patient. Among the 53 LTRs, 11 (20.8%) displayed one or more gDSA, 3 (27.3%) displaying only class I gDSA and 8 (72.7%) only class II gDSA, with a median of 1 gDSA (range 1 – 3) per patient. One LTR displayed a DSA in biopsy eluate not found in the serum. At time of transplantation and at time of biopsy, there was no difference in demographic and clinical characteristics between gDSA+ and gDSA- LTRs (Table 1 and Table 2, respectively). The median time between serum and biopsy sampling was the same between gDSA- (median 0 day, IQR 0 – 42) and gDSA+ (median 7 days, IQR 0 – 83) LTRs ($p = 0.54$). Histologic findings at time of biopsy are also summarized in Table 2 and evidenced a higher proportion of normal biopsies for gDSA- LTRs. Allograft function at the time of biopsy was comparable between gDSA+ and gDSA- LTRs (Table 3).

Characteristics of sDSA and gDSA

A total of 50 sDSA were found, among which were 14 (28%) class I sDSA (6 HLA-A, 2 HLA-B, 6 HLA-C) with a median MFI of 1095 (IQR 652 – 3366) and 36 (72%) class II sDSA (8 HLA-DR, 18 HLA-DQB1, 6 HLA-DQA1, 4 HLA-DP) with a median MFI of 3662 (IQR 1590 – 9113) ($p = 0.004$, Figure 1A). Among these sDSA, 14 (28%) were found in biopsies eluates (s+/g+ DSA) and one DSA was in biopsy only (s-/g+ DSA), for a total of 15

gDSA altogether constituting the gDSA group. Among the DSA detected *in situ*, 4 (26.7%) were class I (2 HLA-A, 1 HLA-B and 1 HLA-C) and 11 (73.3%) were class II (1 HLA-DR, 7 HLA-DQB1, 3 HLA-DQA1). Median MFI of sDSA was 1804 (IQR 940 – 3720) for those not found in biopsies, and was 10383 (IQR 3707 – 19237) for those of the gDSA group ($p = 0.003$, Figure 1B). We used a ROC analysis to define the optimal serum MFI threshold allowing presence of gDSA to be predicted. The area under curve was 0.765 ($p = 0.007$) and the optimal threshold was 6515 (IC 3249 – 9407), offering 66.7% sensitivity and 91.7% specificity, 8 and 0.36 positive and negative likelihood ratios, respectively. Size of the eluted biopsy fragment was higher when gDSA were found (median 8.5 mm³, IQR 4.9 – 11.3) than when they were not (median 5.8 mm³, IQR 1.7 – 6.4) ($p = 0.02$). Relations between sDSA MFI, biopsy fragment size area and gDSA positivity are represented in Figure 1C.

DSA status and post-biopsy outcomes

During the first year follow-up post-biopsy, 20 (37.7%) LTRs experienced a graft loss with a median of 92 days post-biopsy (IQR 20 – 231). LTRs with sDSA, those having gDSA and sDSA not detected in biopsy eluates being pooled, had a one-year post-biopsy graft survival comparable to sDSA- LTRs (Figure 2A). In contrast, LTRs having gDSA displayed a lower one-year post-biopsy graft survival than the gDSA- and the sDSA- LTRs (Figure 2B and 2C). The same findings were observed after censoring LTRs who survived less than 3 months post-biopsy (Figure 2, D to F). Risk factors at time of biopsy for one-year post-biopsy graft survival were analyzed and only presence of gDSA and infection were statistically associated with graft loss in univariate and multivariate analyses (Table 4). During the first year post-biopsy, the only difference between gDSA- and gDSA+ LTRs in terms of therapeutic immunosuppression or infection occurrence was that gDSA+ LTRs were more frequently treated for humoral rejection than LTRs with sDSA only (Table 5). The median total follow-up post-biopsy was 391 days (IQR 214 – 434) and 25 (47.2%) recipients lost their

graft with a median of 212 days post-biopsy (IQR 44 – 358). We analyzed several parameters at time of biopsy in a Cox proportional hazards model. Only presence of gDSA and infection at the time of biopsy were associated with an increased risk of graft loss (Table 6). There was no difference in cause of graft loss or allograft function at the end of follow-up between gDSA+ and gDSA- LTRs (data not shown).

Discussion

We report here for the first time, to our knowledge, that DSA can be identified in eluates from lung transplant biopsies. We observed that anti-HLA antibodies specific for HLA-DQ were the most frequently identified as sDSA and that they were also predominant as gDSA. This strongly supports the hypothesis of a high pathogenic role for anti-DQ DSA, which is increasingly reported for lung as well as for other solid organ transplantations.³⁴⁻³⁶ The prevalence of gDSA was lower than that of s+/g- DSA, which could be in favor of an insufficient sensitivity of the assay. Indeed, gDSA had higher serum MFI values than s+/g- DSA and were preferentially detected in eluates from the larger biopsies. This indicated that we might have missed DSA bound onto the donor tissue when the amount and/or strength of the DSA was too low and/or when the biopsy fragment was too small.³⁷ Nevertheless, we could detect some DSA of very low serum MFI in small biopsies whereas others of relatively high serum MFI were not retrieved *in situ*, despite tissue fragments of substantially bigger size. In line with this, the serum MFI threshold calculated with ROC analysis to predict the presence of gDSA offered quite weak sensitivity and positive likelihood ratio. Moreover, for one LTR we were able to detect one gDSA which was not present in serum, which could represent the situation where the DSA is completely absorbed within the allograft.^{27, 28} In conclusion, it is obvious that the search for DSA into biopsies would greatly benefit from disposing of large tissue fragments in order to consider a negative result as a proof of the absence of DSA *in situ*.

In our cohort, LTRs with gDSA displayed a lower post-biopsy survival when compared with all other LTRs, i.e. those with sDSA only, without DSA or without anti-HLA antibodies. This was not the case when comparing LTRs displaying sDSA with those without sDSA or anti-HLA antibodies. These findings were confirmed by multivariate logistic regression and Cox proportional hazards ratio analysis showing that the presence of gDSA, but not of sDSA, at the time of biopsy, was an independent risk factor for graft loss. Then,

besides the technical considerations discussed above, the clinical management of LTR could benefit from the detection of gDSA. Indeed, although almost all the gDSA were also present in the serum, identifying a gDSA demonstrates that the DSA is able to sufficiently interact with the transplant to exert pathogenic effects. On the contrary, sDSA which were not detectable *in situ* could have an affinity/avidity and/or be produced at a concentration that are not sufficient to render it detectable, or could target antigens that are not sufficiently expressed locally. Interestingly, according to histopathologic findings, more than half of gDSA+ recipients were diagnosed as having signs of acute cellular rejection, of an infectious disease or a normal biopsy, but not of an acute or chronic AMR, whereas the DSA was indeed found interacting with the allograft. In these cases, prospectively performing DSA elution from biopsies and their identification could have helped refining the diagnosis and more precisely guiding recipient management.

Our study has several limitations. Firstly, it is a single-center, retrospective and nonrandomized study on a rather small LTRs cohort. Secondly, the comparison of LTRs characteristics at time of transplantation or biopsy could have been underpowered, not precluding that some risk factors for gDSA presence might exist.³⁴ Thirdly, the lung graft function deterioration was often at an advanced stage at the time of the biopsy, as nearly 40% of recipients had a severe BOS. Therefore, these findings cannot be used for estimating the role of gDSA in the early phase of AMR. Moreover, we did not observe a lower post-biopsy graft survival for LTRs displaying sDSA in comparison with those without sDSA or anti-HLA antibodies. This was in disagreement with reports from the recent literature¹¹⁻¹⁶ and could be explained by a short follow-up after biopsy which did not allow graft loss caused by chronic AMR to be observed.

In conclusion, by showing that the presence of gDSA was associated with graft loss, this study highlights the interest of searching DSA in biopsy eluates, especially in cases where refining a diagnosis could be required and when remnants of stored tissue samples can be

used. This work paves the way for further prospective investigations on large cohorts to analyze whether gDSA could represent a valuable biomarker of AMR in a field where other approaches, such as histopathology, are frequently unhelpful.

Disclosure statement

The authors have no financial conflicts of interest to disclose. This work has benefited from the financial help of the French Agence de la Biomédecine, via the 2013 call-for-proposals. The funders had no role in work design and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Yusen RD, Christie JD, Edwards LB, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:965-78.
2. Finlen Copeland CA, Snyder LD, Zaas DW, Turbyfill WJ, Davis WA, Palmer SM. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:784-9.
3. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:297-310.
4. Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, et al. Respiratory viral infections are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:181-7.
5. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, et al. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:507-13.
6. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1144-52.
7. Jaramillo A, Smith MA, Phelan D, et al. Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. *Transplantation* 1999;67:1155-61.
8. Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA, et al. HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 1998;65:648-53.

9. Girnita AL, McCurry KR, Iacono AT, et al. HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:1135-41.
10. Palmer SM, Davis RD, Hadjiliadis D, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2002;74:799-804.
11. Morrell MR, Pilewski JM, Gries CJ, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:1288-94.
12. Safavi S, Robinson DR, Soresi S, Carby M, Smith JD. De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:1273-81.
13. Ius F, Sommer W, Tudorache I, et al. Early donor-specific antibodies in lung transplantation: risk factors and impact on survival. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:1255-63.
14. Smith JD, Ibrahim MW, Newell H, et al. Pre-transplant donor HLA-specific antibodies: characteristics causing detrimental effects on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:1074-82.
15. Witt CA, Gaut JP, Yusef RD, et al. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:1034-40.
16. Kim M, Townsend KR, Wood IG, et al. Impact of pretransplant anti-HLA antibodies on outcomes in lung transplant candidates. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:1234-9.
17. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011;92:510-5.

18. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl Immunol* 2013;29:17-21.
19. Visentin J, Vigata M, Daburon S, et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation* 2014;98:625-31.
20. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008;86:1111-5.
21. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009;70:844-53.
22. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2013;173:536-43.
23. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* 2014;98:738-44.
24. Visentin J, Marroc M, Guidicelli G, et al. Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation. *Clin Transplant* 2015;29:393-402.
25. Visentin J, Guidicelli G, Moreau JF, Lee JH, Taupin JL. Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation. *Eur J Immunol* 2015;45:2111-21.
26. Glanville AR. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: myth or reality? *J Heart Lung Transplant* 2010;29:395-400.

27. Del Bello A, Congy N, Sallusto F, et al. Anti-human leukocyte antigen immunization after early allograft nephrectomy. *Transplantation* 2012;93:936-41.
28. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, et al. Donor-specific antibodies after ceasing immunosuppressive therapy, with or without an allograft nephrectomy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:1310-9.
29. Neau-Cransac M, Le Bail B, Guidicelli G, et al. Evolution of serum and intra-graft donor-specific anti-HLA antibodies in a patient with two consecutive liver transplantations. *Transpl Immunol* 2015.
30. Westall GP, Snell GI. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: fable, spin, or fact? *Transplantation* 2014;98:927-30.
31. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, et al. Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. *Am J Transplant* 2013;13:2855-64.
32. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:1229-42.
33. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifl  G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003;76:395-400.
34. Lobo LJ, Aris RM, Schmitz J, Neuringer IP. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:70-7.
35. Smith JD, Banner NR, Hamour IM, et al. De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. *Am J Transplant* 2011;11:312-9.

36. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation* 2012;94:172-7.
37. Martin L, Guignier F, Bocrie O, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005;79:1459-61.

Table 1 (Part 1). Patients' characteristics at the time of transplantation.

	Total	gDSA-	gDSA+	p-value
Number of patients (%)	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Recipient gender				0.18
Female (%)	27 (51.0)	19 (45.2)	8 (72.7)	
Male (%)	26 (49.0)	23 (54.8)	3 (27.3)	
Recipient age	48 (27 – 56)	47 (26 – 56)	45 (32 – 55)	0.78
Diagnosis				
Emphysema (%)	19 (35.8)	16 (38.1)	3 (27.3)	0.73
CF (%)	18 (34.0)	15 (35.7)	3 (27.3)	0.73
Fibrosis (%)	9 (16.0)	6 (14.3)	3 (27.3)	0.37
PAH (%)	3 (5.7)	2 (4.8)	1 (9.1)	0.51
Other (%)	4 (7.5)	3 (7.1)	1 (9.1)	1.00
Type of transplant				
Double lung (%)	47 (88.7)	39 (92.9)	8 (72.7)	0.10
Single lung (%)	3 (5.7)	2 (4.8)	1 (9.1)	0.51
Heart-Lung (%)	3 (5.7)	1 (2.4)	2 (18.2)	0.11
Donor age	41 (32 – 55)	42 (32 – 53)	41 (33 –60)	0.78
Extended criteria donor (%)	34 (64.2)	28 (66.7)	6 (54.5)	0.50
Ischemic time (min)	377 (301 – 427)	366 (295 – 420)	380 (360 – 459)	0.21
Induction therapy* (%)	29 (54.7)	23 (54.8)	6 (54.5)	1.00
Early acute cellular rejection (≤ 3 months) (%)	23 (43.4)	20 (47.6)	3 (27.3)	0.31
HLA-A/B MM	3 (3 – 4)	4 (3 – 4)	3 (2 – 3)	0.07
HLA-DR/DQ MM	3 (2 – 4)	3 (2 – 4)	3 (2 – 4)	0.67
HLA A/B/DR/DQ MM	6 (5 – 7)	6 (5 – 7)	5 (5 – 7)	0.11
Pre-transplant HLA sensitization				
None (%)	31 (58.5)	27 (64.3)	4 (36.4)	0.17
Anti-HLA (%)	11 (20.8)	8 (19.0)	3 (24.3)	0.68
DSA (%)	11 (20.8)	7 (16.7)	4 (36.4)	0.21
Table 1 (Part 2)				

	Total	gDSA-	gDSA+	p-value
Positive CDCXM (%)	0	0	0	NA
Positive FCXM (%)	2 (3.8)	0	2 (18.2)	NA
CMV status				
D+/R- (%)	20 (37.7)	17 (40.5)	3 (27.3)	0.50
D+ or D-/R+ (%)	19 (35.8)	15 (35.7)	4 (36.4)	1.00
D-/R- (%)	14 (26.4)	10 (23.8)	4 (36.4)	0.45

Values are expressed as median (interquartiles) or as number (%) when specified. CDCXM: complement dependent cytotoxicity crossmatch; CF: cystic fibrosis; CMV: cytomegalovirus; D: donor; DSA: donor-specific antibodies; FCXM: flow cytometry crossmatch; gDSA: intra-graft DSA; HLA: human leukocyte antigens; MM: mismatch; NA: not applicable; PAH: pulmonary arterial hypertension; R: recipient. Statistical tests: categorical variables were analyzed with Fisher's exact test and continuous variables with Mann-Whitney U test. *: anti-thymocyte globulins

Table 2. Patients' characteristics and histology at the time of biopsy.

	Total	gDSA-	gDSA+	p-value
Number of patients (%)	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Recipient age	50 (31 – 58)	49 (29 – 58)	52 (34 – 58)	0.83
Time from transplantation (days)	507 (75 – 1128)	281 (80 – 1102)	554 (135 – 1119)	0.90
Early biopsies (≤ 3 months from transplantation) (%)	16 (30.2)	13 (31.0)	3 (27.3)	1.00
Type of biopsy				0.30
Surgical (%)	20 (37.7)	14 (33.3)	6 (54.5)	
Transbronchial (%)	33 (62.3)	28 (66.7)	5 (45.5)	
Biopsy indication				
Respiratory function decline (%)	27 (50.9)	21 (50.0)	6 (54.5)	1.00
ARDS (%)	10 (18.9)	7 (16.7)	3 (27.3)	0.42
Dyspnea (%)	7 (13.2)	7 (16.7)	0	NA
Protocol biopsy (%)	8 (15.1)	6 (14.3)	2 (18.2)	0.67
Radiologic (%)	1 (1.9)	1 (2.4)	0	1.00
Serum sample to biopsy (days)*	3 (2 – 13)	6 (1 – 13)	3 (2 – 19)	0.72
Treatment**				
Ciclosporine (%)	36 (67.9)	28 (66.7)	8 (72.7)	1.00
Tacrolimus (%)	17 (32.1)	14 (33.3)	3 (27.3)	1.00
Everolimus (%)	7 (13.2)	6 (14.3)	1 (9.1)	1.00
Azithromycin (%)	29 (54.7)	23 (54.8)	6 (54.5)	1.00
Histologic findings				
Bronchiolitis Obliterans (%)	10 (18.9)	6 (14.3)	4 (36.4)	0.19
Acute rejection (%)	10 (19.9)	7 (16.7)	3 (27.3)	0.42
Infectious Disease (%)	12 (22.6)	9 (21.4)	3 (27.3)	0.70
Normal biopsy (%)	20 (37.7)	19 (45.2)	1 (9.1)	0.04
Thrombosis (%)	1 (1.9)	1 (2.4)	0	1.00

Table 2 - footnotes

Values are expressed as median (interquartiles) or as number (%) when specified. ARDS: acute respiratory distress syndrome; NA: not applicable. Statistical tests: categorical variables were analyzed with Fisher's exact test and continuous variables with Mann-Whitney U test. *: absolute value, **: treatment associated cyclosporine or tacrolimus plus mycophenolate acid and corticosteroids +/- everolimus and/or azithromycin.

Table 3. Allograft function at the day of biopsy.

	Total	gDSA-	gDSA+	p-value*
Number of patients (%)	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Allograft function at biopsy				
BOS 0 (%)	8 (15.1)	7 (13.2)	1 (9.1)	1.00
BOS 0p (%)	6 (11.3)	4 (7.5)	2 (18.2)	0.59
BOS 1 (%)	6 (11.3)	6 (11.3)	0	NA
BOS 2 (%)	11 (20.8)	6 (11.3)	5 (45.5)	0.04
BOS 3 (%)	9 (17.0)	9 (17.0)	0	NA
BOS (%)	26 (49.1)	21 (50)	5 (45.5)	1.00
High-grade BOS (≥ 2) (%)	20 (37.7)	15 (35.7)	5 (45.5)	0.73
ND (%)	13 (24.5)	10 (18.9)	3 (27.3)	1.00

* Fisher's exact test. BOS: bronchiolitis obliterans syndrome; NA: not applicable; ND: not determinable because of recipient intubation.

Table 4. Univariate and multivariate analysis of risk factors at time of biopsy associated with graft loss at one-year post-biopsy.

	Univariate			Multivariate		
	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
ARDS	1.04	0.29-3.78	0.95			
Acute rejection	1.87	0.47-7.49	0.38			
Infection	3.02	0.80-11.32	0.10	5.65	1.13-28.21	0.03
BOS	1.06	0.35-3.34	0.91			
Severe BOS	2.30	0.73-7.25	0.15	3.39	0.85-13.54	0.08
DSA	2.23	0.71-7.01	0.16*			
gDSA	6.67	1.51-29.47	0.008	5.85	1.23-27.68	0.03

ARDS: acute respiratory distress syndrome; BOS: bronchiolitis obliterans syndrome; CI: confidence interval; DSA: donor specific antibodies; gDSA: intragraft DSA; OR: odds ratio.*: No OR value in multivariate analysis because of an exclusion from the model during the backward elimination procedure.

Table 5. Treatment modifications and infections during the first year post-biopsy

	Total	gDSA-	gDSA+	p-value
Number of patients	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Corticosteroid bolus	20 (37.7)	15 (35.7)	5 (45.5)	0.73
Thymoglobulins	7 (13.2)	5 (11.9)	2 (18.2)	0.63
Tacrolimus switch*	18 (34.0)	13 (31.0)	5 (45.5)	0.48
Everolimus introduction	15 (28.3)	11 (26.2)	4 (36.4)	0.71
Azithomycin introduction	11 (20.8)	9 (21.4)	2 (18.2)	1.00
IVIg + RTX +/- PE**	14 (50.0)	5 (29.4)	9 (81.8)	0.018
Bacterial infection after biopsy	38 (71.7)	29 (69.0)	9 (81.8)	0.48

Values are expressed as number (%) analyzed with Fisher's exact test. *: substitution of ciclosporin by tacrolimus, **: Intravenous immunoglobulin + rituximab +/- plasma exchange, comparison of recipients with sDSA only.

Figures legends

Figure 1: Characteristics of DSA detected in serum and in biopsy eluates with SAFB.

(A) Serum MFI of class I and II DSA and (B) serum MFI of DSA detected in biopsy eluates or not. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. MFI were compared using the Mann-Whitney U-test. (C) Link between serum MFI, biopsy fragment size and gDSA positivity. DSA: donor specific antibodies, gDSA: intragraft DSA, MFI: mean fluorescence intensity, SAFB: single antigen flow beads.

Figure 2: One-year post-biopsy graft survival according to DSA status. (A) Comparison of graft survival between recipients having DSA or not, with those having gDSA or sDSA not detected in biopsy eluates being pooled. (B) Comparison of graft survival between recipients having gDSA or not, with those having sDSA not detected in biopsy eluates and those with no DSA being pooled. (C) Comparison of graft survival between recipients having gDSA, sDSA not detected in biopsy eluates and no DSA. Panels (D), (E) and (F) represent the same analysis as in (A), (B) and (C), respectively, after exclusion of recipients that survived less than 3 months post-biopsy. Graft survival was compared using the log-rank test. DSA: donor specific antibodies, gDSA: intragraft DSA.

FIGURE 1

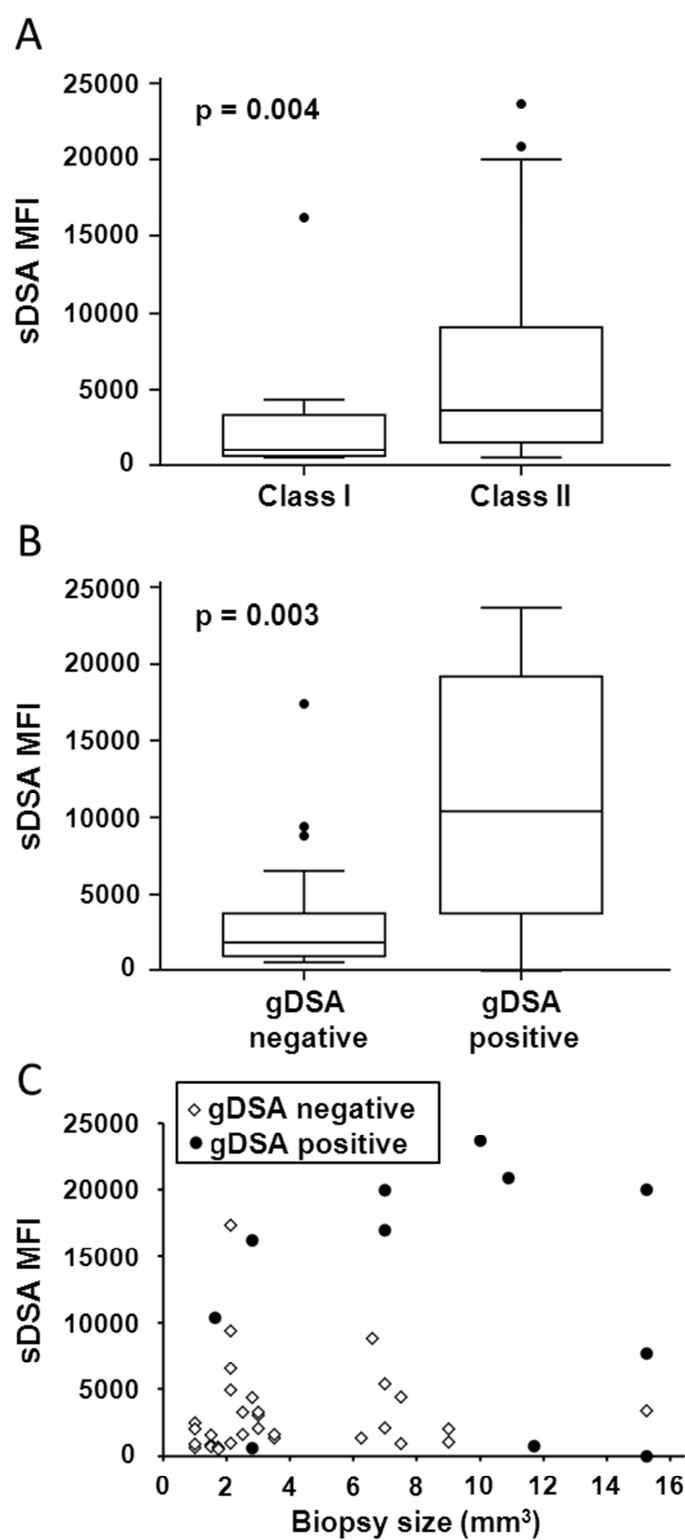
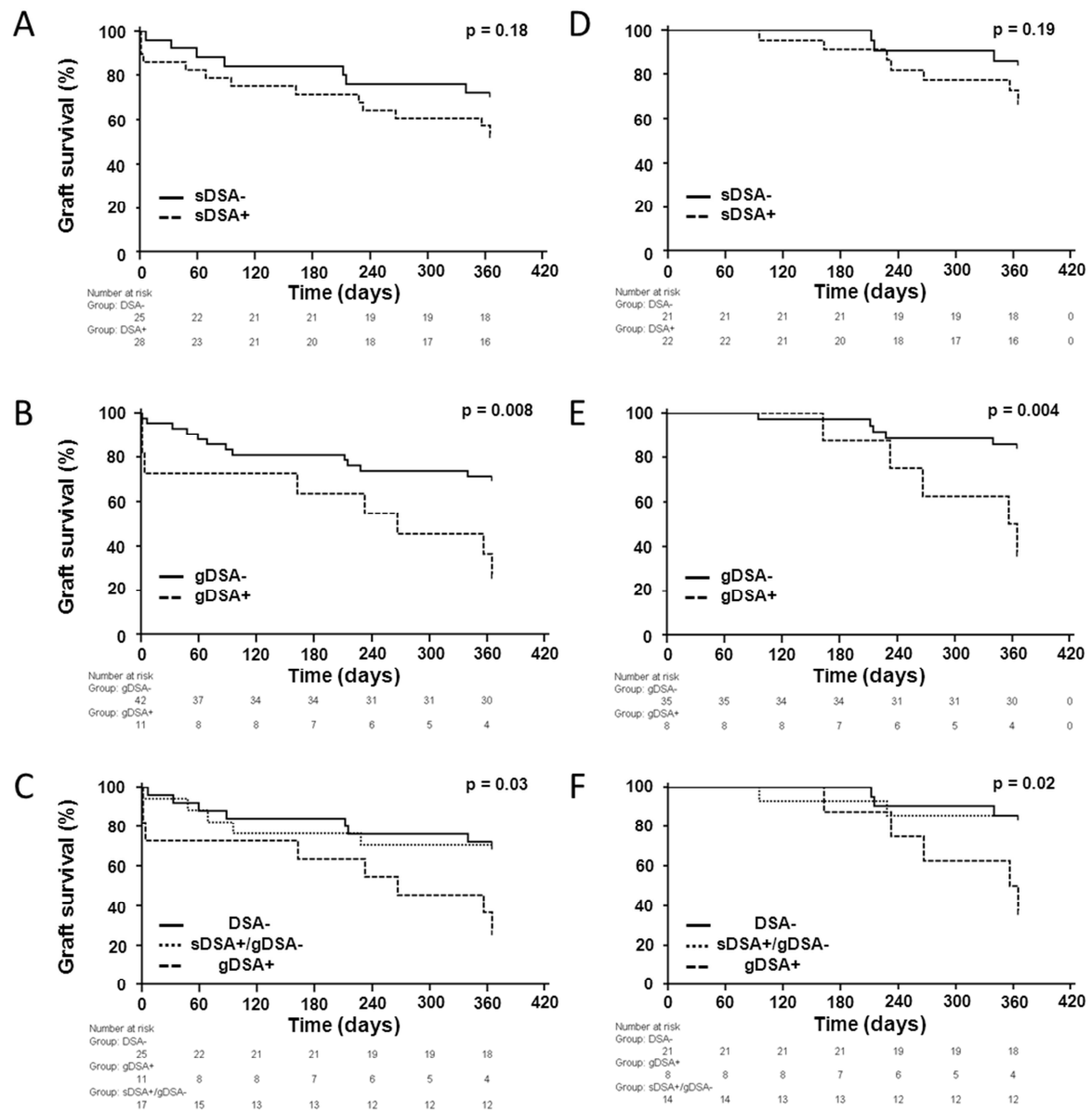


FIGURE 2



VIII-2 – Huitième article : Utilisation de la résonance plasmonique de surface pour la mesure de la concentration et de l'affinité des anticorps anti-HLA

Article publié dans la revue *Talanta*

« Calibration free concentration analysis by surface plasmon resonance in a capture mode »

Jonathan Visentin, Laetitia Minder, Jar-How Lee, Jean-Luc Taupin and Carmelo Di Primo

Présentation et objectifs du travail

Les deux premières parties de notre travail étaient dédiées à une meilleure compréhension des résultats obtenus avec le SAG, qui est actuellement la technique de référence pour identifier les anticorps anti-HLA. Comme nous l'avons vu dans le septième article présenté, cette technique permet également de détecter les DSA *in situ*. La présence de DSA intra-greffon est une preuve formelle de l'interaction des DSA avec le greffon. Néanmoins, le SAG étant une technique en point final, celui-ci ne reflète pas les modalités de cette interaction *in vivo*, c'est-à-dire qu'il ne permet pas d'apprécier les constantes cinétiques d'interaction entre les DSA et leurs cibles, ni même leur concentration dans le sérum, alors que ces propriétés pourraient influencer sur leur pathogénicité. Nous avons alors pensé que la SPR pouvait répondre à ces questions et entrepris d'adapter cette méthode à l'étude des anticorps anti-HLA de classe I.

Nos premiers essais utilisaient une stratégie classique, c'est-à-dire que nous avons immobilisé de manière covalente des molécules HLA-A2, purifiées à partir de lysats cellulaires (One Lambda, Inc.) sur une puce CM5, puis injecté sur cette surface une solution de W6/32 ou de sérums de patients contenant des anticorps anti-A2. Une interaction était visible, cependant nous ne parvenions pas à régénérer la surface sans détruire les molécules HLA immobilisées. Ceci excluait la possibilité d'utiliser la SPR dans ces conditions. Nous avons en effet évoqué dans la partie introductive le fait que la surface nécessite de pouvoir être régénérée afin de répéter les injections nécessaires à l'analyse et diminuer les coûts et la consommation du ligand.

Nous avons alors décidé de tenter une approche en mode capture, c'est-à-dire d'immobiliser dans un premier temps un anticorps anti-HLA reconnaissant un épitope monomorphe, puis de capturer une quantité fixe et définie de molécules HLA, puis d'injecter la solution d'anticorps anti-HLA à étudier. Afin de réaliser des études cinétiques fiables, nous devons connaître la concentration active de l'anticorps à étudier, et donc réaliser une CFCA. Cette méthode d'analyse n'étant pas décrite dans la littérature sous un mode capture, nous avons tout d'abord cherché à atteindre ce but.

Mon rôle dans cette étude a consisté en la réalisation des expériences de SPR puis à analyser les résultats obtenus et à rédiger l'article. Ceci a été possible grâce à l'aide du Dr Carmelo Di Primo, responsable de la plateforme de SPR de l'Institut Européen de Chimie et

Biologie situé à Pessac, et Laëtitia Minder, assistant ingénieur en charge de la plateforme, qui m'ont formé et rendu autonome pour l'utilisation du Biacore™ T200.

Afin de valider la possibilité d'utiliser la CFCA en mode capture, nous avons comparé les concentrations actives d'une solution de HLA-B*44:02 mesurée à l'aide de deux systèmes différents (Figure 1, systèmes 1 et 2) : le premier était une CFCA en mode covalent, classique, un anticorps anti-B2M étant directement immobilisé sur la puce, et le deuxième était une CFCA en mode capture, l'anticorps anti-B2M étant capturé par un anticorps de rat anti-IgG2a de souris. Ces deux systèmes permettaient d'obtenir les conditions de limitation de transport de masse nécessaires à la réalisation d'une CFCA (Figure 2) et mesuraient des concentrations actives en HLA-B44:02 similaires (Table 1). Nous sommes ensuite parvenus à mesurer la concentration active du W6/32 à l'aide d'un troisième système (Figure 1, système 3), l'anti-B2M étant immobilisé sur la surface et permettant la capture de trois antigènes HLA différents. Les concentrations actives mesurées avec ces trois antigènes étaient similaires (Table 2). Nous avons ensuite exploré la flexibilité de la CFCA en mode capture avec les systèmes 2 et 3 en diminuant progressivement la quantité d'anti-B2M (système 2) ou d'antigène HLA (système 3) capturé. Comme attendu, la diminution du niveau de capture réduisait le phénomène de limitation de transport de masse, comme indiqué par la diminution progressive du QC ratio, mais les concentrations actives mesurées restaient comparables mêmes quand ce dernier passait en dessous du seuil de 0,2 conseillé par le fabricant (Figure 4). Enfin, la connaissance de la concentration active du W6/32 nous a permis de déterminer les constantes cinétiques d'interaction de celui-ci avec les trois antigènes HLA précédemment utilisés, par l'utilisation de la méthode « *single cycle kinetics* » en mode capture. L'ajustement des sensorgrammes était satisfaisant pour les trois antigènes (Figure 5) et les constantes cinétiques comparables pour cet anticorps qui reconnaît un épitope conservé entre les molécules HLA de classe I (Table 3).

Title:

**Calibration free concentration analysis by surface plasmon resonance in a
capture mode**

Authorship: Jonathan VISENTINA^{a,b}, Laetitia MINDER^{c,d}, Jar-How LEE^e, Jean-Luc TAUPIN^{a,b,1} and Carmelo DI PRIMO^{*,f,g}

^aCHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux, France; ^b Université de Bordeaux, UMR CNRS 5164, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, France; ^c Université de Bordeaux, UMS 3033, Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 Rue Robert Escarpit, Pessac, France; ^d Institut Bergonié, SIRIC BRIO, 229 Cours de l'Argonne, Bordeaux, France; ^e One Lambda, Inc., 21001 Kittridge, Canoga Park, CA, USA; ^f Université de Bordeaux, Laboratoire ARNA, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux, France; ^g INSERM, U869, Laboratoire ARNA, IECB, 2 rue Robert Escarpit, Pessac, France; ¹ Present address: AP-HP, Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, Paris, email jean-luc.taupin@aphp.fr

*To whom correspondence should be addressed:

Mail: Carmelo Di Primo, U869 INSERM, IECB, 2, Rue Robert Escarpit, 33607 Pessac cedex, France

Email: carmelo.diprimo@inserm.fr, Tel +33 540003046/ Fax +33 540003068

Abstract

Surface plasmon resonance (SPR) is the gold standard for determining rate and equilibrium constants of bimolecular complexes. Accuracy of these parameters depends on the correct determination of the concentration of the injected analyte. Calibration free concentration analysis (CFCA) has been developed to overcome the limitation of measuring protein concentrations spectroscopically, which may overestimate the fraction of the protein that really binds to the immobilized ligand, *i.e.* the active concentration. In this work, we demonstrate that CFCA can also be implemented in a capture format for measuring active concentrations. Capture CFCA (CCFCA) was first validated by measuring the concentration of a HLA-B*44:02 antigen solution. The active concentration of this molecule determined by CCFCA was similar to that obtained by covalent CFCA. CCFCA was then used to determine the concentration of the W6/32 pan class I HLA monoclonal antibody over three different HLA molecules captured by another specific antibody. This could not have been performed by covalent CFCA because immobilized HLA molecules cannot withstand regeneration. By exploring different capture levels we also show that CCFCA gives consistent results even at low capture levels. Knowing the active concentration of W6/32, we then determined the rate and equilibrium constants of W6/32-HLA complexes on the same flow cell. CCFCA is of general use for measuring active concentrations and of great interest for analytes recognizing ligands that cannot be covalently immobilized on sensor chips. The capture mode also allows determining the kinetic constants of multiple analyte-ligand complexes on the same flow cell. This increases experiments throughput and reduces sensor chip consumption.

Keywords: Surface Plasmon Resonance; Capture; Calibration Free Concentration Analysis; Single Cycle Kinetics; Affinity; HLA antibodies

Abbreviations

B2m: Beta-2 microglobulin

BCA: Bicinchoninic Acid assay

CCFCA: Capture Calibration Free Concentration Analysis

CFCA: Calibration Free Concentration Analysis

DSA: Donor Specific Antibody(ies)

HLA: Human Leucocyte Antigens

mAb(s): Monoclonal Antibody(ies)

RU: Response Units

SCK: Single Cycle Kinetics

SPR: Surface Plasmon Resonance

Introduction

Biosensors based on the surface plasmon resonance (SPR) principle monitor in real time complexes formed between two partners, the ligand being immobilized at a liquid-solid interface on a sensor chip, and the analyte being injected in a continuous flow of buffer [1,2]. This technology has become the gold standard for determining the characteristics of antigen-antibody interactions, especially the affinity of antibodies for their antigenic target [3-5]. The dissociation equilibrium constant, K_D , is determined either by steady-state analysis or kinetically, by measuring the ratio of the dissociation and association rate constants, k_d and k_a , respectively [6]. The rate constants are determined by direct curve fitting of sensorgrams [response units (RU) as a function of time] thanks to dedicated softwares. Noteworthy, an accurate determination of the analyte concentration is crucial for determining the rate and the equilibrium constants of a reaction. A very useful method named Calibration Free Concentration Analysis (CFCA) was developed, which allows the concentration that relates to the specific binding activity of an interacting compound to be determined, namely the active concentration [7-10]. Also, a major advantage of CFCA is that a standard curve is dispensable for measuring concentrations, as it only relies on the change of initial binding rates with varying flow rates under conditions of limited mass transport.

Human Leucocyte Antigens (HLA) are cell surface proteins whose main function is to present endogenous and exogenous peptides to T lymphocytes, in order to activate effector and regulatory functions of these immune cells [11]. Class I HLA molecules (HLA-A, -B and -C) are heterotrimers constituted by a polymorphic heavy chain associated to a monomorphic light chain, the beta-2 microglobulin, and a peptide. The exposure to mismatched HLA molecules during pregnancy, after transfusion or upon organ transplantation can lead to the production of allogenic HLA antibodies. These antibodies recognize the amino acids located at polymorphic positions which are different between the subject and the foreign HLA

molecules. HLA antibodies are deleterious for organ transplant function and survival when they are donor-directed (the so-called donor-specific HLA antibodies or DSA) [12-15].

To date, the most commonly assay used to determine whether a DSA is present or not is the Single Antigen flow bead assay. It allows patients' sera to be studied with the 200 most frequent class I and class II HLA alleles, with high resolution and sensitivity thanks to a multiplex principle and a fluorescent read out, respectively [16-18]. This assay is most often used in a semi-quantitative fashion, considering that the measured fluorescence value trustfully mirrors the pathogenic strength of the DSA, but this has not been validated yet [19]. Therefore, a real quantitative measurement of HLA antibody concentration and affinity with SPR would be an important step towards deciphering the pathogenic potential of DSA. However, HLA molecules are not covalently linked heterotrimers. Therefore, if covalently immobilized on a sensor chip surface, we can reasonably expect them to be sensitive to the chemicals used for regenerating the functionalized surfaces, like, as a well-known example, low pH solutions [20,21]. Indeed, in our hands, the regeneration solutions that were efficient for dissociating antigen-antibody complexes also irreversibly altered the antibody binding capacity of the HLA target immobilized on the sensor chip surface. In addition, covalent immobilization would drastically reduce the screening capability of the assay which is performed with instruments having only four flow-cells, such as those from Biacore™, given that hundreds of different HLA molecules exist. A capture approach would actually be the most convenient solution to circumvent these impediments, by using a regenerable monoclonal antibody (mAb) to capture HLA molecules through a monomorphic epitope, before injecting the HLA antibody to be characterized.

In this work, using the HLA/HLA antibody system as an experimental model, we demonstrate that the SPR CFCA method can also be used in a capture format (CCFCA for Capture CFCA). CCFCA is of general use and clearly expands the use of SPR for measuring the active concentration of analytes recognizing ligands that cannot be covalently attached to

sensor chip surfaces, such as HLA molecules. In addition the capture mode allows determining the kinetic constants of multiple analyte-ligand complexes on the same flow cell, increasing experiments throughput while reducing sensor chips consumption.

Material and methods

Antibodies and HLA molecules

The pan class I anti-HLA W6/32 and anti-beta2-microglobulin (anti-B2m) (clone B2M-01) mouse mAbs, of the IgG2a isotype, were purchased from ThermoFisher Scientific (Rockford, IL). Both mAbs recognize all class I HLA molecules in their native form only. The rat anti-mouse IgG2a (clone R11-89) mAb was purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The purified HLA-A*02:01, A*11:01 and B*44:02 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) were dialyzed against phosphate buffered saline with 0.05% Tween (PBS-T) (Sigma-Aldrich, St Louis, MI) with a 20 kDa cut-off Float-A-Lyzer G2 device (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA).

Surface plasmon resonance experiments

SPR experiments were performed at 25°C with a Biacore™ T200 apparatus (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) on CM5 and CM7 sensorchips (Biacore™). The sensorgrams were analyzed with the Biacore T200 Evaluation Software. Antibodies were immobilized by amine coupling using a mixture of N-hydroxysuccinimide and N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare), after dilution in a 10 mM, pH 5, sodium acetate buffer (10 mM, pH 5), followed by an injection of ethanolamine (1 M, pH 8.5, GE Healthcare) to deactivate the sensor chip surface. A flow cell left blank was used for double-referencing of the sensorgrams [22]. Spikes still present after this step were not removed because they did not affect the results, as previously shown [23,24]. The samples were prepared in PBS-T (Sigma-Aldrich), which constituted the running buffer. Surface regeneration was achieved with a 1 min pulse of 10 mM glycine pH 2.1 (GE Healthcare) followed by a 1 min pulse of running buffer.

Concentration measurements

CFCA experiments were performed with or without preliminary capture of the ligand. The analytes were injected for 50 s first at 2 or 5 µl/min, and then at 100 µl/min. All the samples and blanks were injected in duplicate. HLA and mAb diffusion coefficients were calculated using the formula

$$D = 342.3 \times 1/(\sqrt[3]{MW} \times f \times h_{rel}) \times 10^{-11} \quad (1)$$

where MW is the molecular weight equal to 58,000 and 150,000 Da for purified HLA and mAb, respectively, f is the frictional ratio (value 1.2 for globular proteins), and h_{rel} is the relative viscosity (value 0.89 à 25°C). Concentration measurements validation criteria were those recommended by Biacore™, i.e. a sufficiently high initial binding rate at low flow (for example, higher than 0.3 RU/s at 5 µl/min) and sensorgrams sufficiently separated, as reflected by a QC ratio fit higher than 0.2. The QC ratio is the quotient Q reflecting the degree of mass transport limitation:

$$Q = \frac{\text{initial rate at high flow rate}}{\text{initial rate at low flow rate}} \times \sqrt[3]{\frac{\text{low flow rate}}{\text{high flow rate}}} \quad (2)$$

Kinetics measurements

Binding kinetics were performed in a capture mode on the sensor chips used for the CFCA assays but after capturing low amounts of HLA molecules (less than 100 RU) to avoid artifacts sometimes observed with high ligand densities. Experiments were performed at 25 µl/min using the single cycle kinetics (SCK) method [24,25]. Three successive increasing concentrations of the analyte were injected with no regeneration between each injection. Samples and blanks were injected in duplicate. The association and dissociation rate constants, k_a and k_d, respectively, were determined by direct curve fitting of the sensorgrams to a Langmuir 1:1 model of interaction, as described previously [24]. The dissociation

equilibrium constant, K_D , was calculated as k_d/k_a . Constants are expressed as mean \pm standard deviation.

Results

CFCA can be performed in a capture mode

We first sought to determine the active concentration of a purified HLA molecule, HLA-B*44:02. A classical, covalent CFCA (Figure 1, Strategy #1) was carried out using high amount (16,000 RU) of anti-B2m immobilized on a CM5 sensor chip, on which two 100-fold diluted HLA-B*44:02 stock solutions were injected at two different flow rates (2 and 100 $\mu\text{l}/\text{min}$). As shown in Figure 2A, the sensorgrams were consistent with the mass transport limitation required to measure active concentration by SPR, i.e. the binding rates clearly depended on the flow rates. A 15 nM concentration was measured from direct fitting of the slopes (Table 1), which corresponded to a concentration of the HLA-B*44:02 stock solution equal to 1.5 μM .

We then tested whether CFCA could be performed in a capture mode (Figure 1, Strategy #2). A rat anti-mouse IgG2a was immobilized (17,000 RU) on another flow cell of the CM5 sensor chip, then a high amount of anti-B2m antibody (4,000 RU) was captured as shown in Figure 2B. The same 100-fold diluted HLA-B*44:02 solutions as for covalent CFCA were injected at 2 and 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. The sensorgrams are reported in Figure 2C. The concentration of HLA-B*44:02, determined from the two fitted slopes, was equal to 15.5 ± 2.1 nM (Table 1), corresponding to a concentration of the stock solution equal to 1.55 ± 0.21 μM . This result agreed well with that obtained with the covalent assay. Noteworthy, the concentration of the HLA-B*44:02 stock solution measured using a bicinchoninic acid assay (BCA) was 4.9 μM , i.e. 3.3 times higher than the active concentration determined by covalent CFCA and CCFCA.

CCFCA of anti-HLA antibodies

As mentioned above, the HLA targets could be easily immobilized but they were instantaneously denaturated by all the effective regeneration solutions we tested for dissociating antibodies from the surface. Therefore we implemented a capture experiment referred to as Strategy #3 in Figure 1, in order to measure the active concentration of the W6/32 mAb. Three different HLA alleles, A*02:01, A*11:01 and B*44:02, were captured to assess the consistency of the W6/32 active concentration determined by CCFCA.

Firstly, we measured the active concentration of the HLA targets A*02:01 and A*11:01 alleles by covalent CFCA as carried out with HLA-B*44:02 (Figure 2A). The corresponding sensorgrams are reported in the SI (Figure S1). The concentrations ($5.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and $0.67 \pm 0.04 \mu\text{M}$) determined for A*02:01 and A*11:01, respectively, were 2.1 and 2.7 times lower than those measured by BCA assay (12.1 and $1.8 \mu\text{M}$).

Then, we measured the active concentration of W6/32 by CCFCA. The mAb was injected at two different flow rates, 5 and $100 \mu\text{l/min}$, over each of the three HLA molecules (2,000 RU) captured by covalently immobilized anti-B2m antibody (16,000 RU). The slopes of the CCFCA sensorgrams reported in Figure 3 were fitted to determine the active concentration of W6/32 for the three ternary complexes formed on the sensor chip surface. The results are presented in Table 2. The active concentration, $2.8 \mu\text{M}$ on average, determined from two independent experiments, was very similar for the three different alleles. Of note, the active concentration of W6/32 determined by CCFCA was 2.4 times lower than the concentration determined spectrophotometrically ($6.7 \mu\text{M}$).

CCFCA can be performed even with low capture levels

We sought to explore the limitations of CCFCA by using different levels of captured ligand. Firstly, we measured the active concentration of a new 300-fold diluted HLA-A*02:01 stock solution by CCFCA (Strategy #2). For this experiment, capture duration and/or anti-B2m concentration were adapted to obtain six capture levels (Figure 4A and S3) lower than

the 4000 RU previously used. Although we observed a decrease of the QC ratio, the active concentration determined with CCFCA still agreed with that obtained with a covalent assay (Strategy #1) performed in parallel (Table S1), even at QC values below the limit recommended by Biacore™.

We then measured the active concentration of a 1000-fold diluted W6/32 solution by CCFCA (Strategy #3) with capture levels of HLA-A*02:01 lower than the 2000 RU used previously (Figure 4B and S4). With this complex we also observed a decrease of the QC ratio as the capture level decreased, but the measured active concentration of W6/32 remained nearly the same even at low capture level (Table S2).

After exploring the lower limit of CCFCA, we analyzed whether CCFCA and CFCA could be performed on a CM7 sensor chip. These surfaces have a higher degree of dextran carboxylation and a denser matrix compared with CM5 sensor chips. Our aim was to use very high immobilization and capture levels in order to favor mass transport limitation. We indeed could immobilize a higher quantity of anti-B2m mAb, 43,000 RU instead of 16,000 RU on a CM5, but when we performed a covalent CFCA of a 300-fold diluted HLA-B*44:02 solution (Figure S5), we observed a significantly lower active concentration (2.000 ± 0.003 nM) than that obtained on a CM5 sensor chip (3.600 ± 0.006 nM), despite a correct QC ratio (0.56 to 0.58). Therefore we did not attempt to perform a CCFCA on CM7 sensorchip.

Kinetic analysis of anti-HLA antibodies

Having accurately determined the active concentration of W6/32 by CCFCA, we determined the rate and equilibrium constants for the W6/32-HLA complexes.

A low amount (less than 100 RU) of the three HLA alleles, A*02:01, A*11:01 and B*44:02 was first captured by the anti-B2m antibody immobilized on the sensor chip surface, and then W6/32 was injected. The sensorgrams are presented in Figure 5. As reported in Table 3, no significant difference was observed for W6/32 binding to the three different

alleles. On average from three independent experiments, k_a , k_d and K_D were equal to $1.8 \pm 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $7.2 \pm 0.3 \times 10^{-11} \text{ M}$, respectively.

Discussion

When SPR is used for characterizing bimolecular complexes, only the concentration of the analyte, the injected partner, is actually required to fit the sensorgrams to a Langmuir 1:1 model of interaction. Therefore this concentration must be known accurately. In general, nucleic acid and protein concentrations are determined spectrophotometrically, either directly, in the UV range, or after staining, in the visible range, e.g. with the BCA assay for proteins. The major weakness of these assays is that they measure total concentrations, i.e. not only the amount of the correctly folded but also potentially unfolded and/or degraded forms, as well as contaminants that could persist in purified samples [10]. CFCA is a powerful method because it solely measures the fraction of the analyte that is able to interact with its ligand immobilized on the sensor chip [7-10]. This fraction is referred to as the "active" form of the protein. In line with this, in our experimental protein model of HLA antigens and HLA antibodies, we observed significantly lower active concentrations of HLA molecules and W6/32 mAb, as measured with CFCA or CCFCA, compared with other methods. Furthermore, a reference material is not always available to set calibration curves. This is the case for HLA antibodies, which are thought to have different binding kinetic properties depending on the epitopes they recognize. Here again CFCA allows overcoming this difficulty.

It is well known that class I HLA molecules are trimolecular complexes of delicate handling because their components are not covalently linked. In line with this, processes used to coat them on Single Antigen Flow Beads, the most sensitive and resolute tool currently available to study HLA antibodies in clinical setting, denature part of them [20,21]. In our hands, the regeneration solutions that were efficient for dissociating antigen-antibody complexes also irreversibly altered the antibody binding capacity of the HLA target immobilized on the sensor chip surface (data not shown). This being an impediment for SPR

experiments, we sought to use a capture system with an easily regenerable mAb recognizing a monomorphic epitope that could be used for all class I HLA molecules.

To our knowledge, CFCA in a capture mode has never been described so far. The covalent CFCA and the CCFCA assays provided identical results for the measurement of the active concentration of HLA-B*44:02, validating that CCFCA is a valuable alternative to covalent CFCA. A mass transport limitation condition is crucial to measure active concentrations. This condition is favored by high ligand density on the sensor chip surface. During validation of the CCFCA approach, we measured HLA-B*44:02 concentration with 16,000 RU of anti-B2m mAb covalently linked to the surface, but with only 4,000 RU of the same mAb captured by another mAb. Nevertheless, concentration measurement was possible and reliable despite a lower mass transport limit, as indicated by a lower QC ratio (Table 1).

We further validated the CCFCA approach by showing that the W6/32 active concentration was reliably determined with three different HLA alleles. This result was expected, because W6/32 recognizes an epitope shared by all conformationally intact class I HLA molecules. We further analyzed these three complexes by investigating their binding kinetics. The rate and dissociation equilibrium constants were similar for the three alleles (Table 3).

By exploring different capture levels we show that CCFCA can be used with low ligand densities. The measured active concentrations were still consistent even below the 0.2 threshold for the QC ratio which is recommended by Biacore™ to validate the results. This suggested that a slight leeway exists for this validation criterion.

After having explored the lower limit of ligand capture, we aimed to perform a CFCA with a CM7 sensor chip. This chip was designed to provide a higher immobilization capacity for investigating complexes with small analytes that are injected, increasing the signal to noise ratio. We could indeed immobilize a higher amount of anti-B2m mAb with the protocol that we used for the CM5 sensor chip, but we obtained a significantly lower active concentration of HLA molecules. This clearly suggests, as pointed out by Biacore™, that only CM5 sensor

chips should be used because the CFCA method has not been validated on other surfaces. It is not clear to us whether this is a general rule or whether the ligand at an excessive density on the surface could prevent the free diffusion of large molecules such as HLA or antibodies.

Of note, CCFCA and then SCK of W6/32 were performed during the dissociation phase of HLA molecules from the immobilized anchor. Because the rate of this dissociation was slow enough ($2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) we considered this phase as being equivalent to a new baseline, as shown previously with the SCK of DNA complexes dissociating from an immobilized anchor.¹⁷ Therefore, in this case, the W6/32-HLA complex could be analyzed as any other bimolecular complex having one of its partners covalently immobilized. Obviously, the CCFCA could even be used with anchor-ligand complexes having faster dissociation rates, as long as the remaining quantity of captured ligand is sufficient to maintain mass transport limitation condition during analyte injection.

CCFCA has other advantages to study class I HLA antibodies. Firstly, the possibility to capture different class I HLA alleles with the same anti-B2m mAb allows interactions for different HLA alleles and HLA antibodies to be studied on one flow cell of the same sensor chip. Secondly, by controlling the quantity of HLA to be captured, both CCFCA and SCK of HLA antibodies, which require high and low ligand densities, respectively, can be performed on the same flow cell again. Thirdly, we mentioned that the anti-B2m antibody only captures native class I HLA molecules, as the functional trimolecular complex associates the heavy chain, the B2m and the peptide. Therefore, our system allows studying anti-native HLA antibodies only, which are those thought to be clinically relevant, in contrast to those that recognize denatured HLA molecules but are detected with routinely used assays [20,26].

In conclusion, our study demonstrates for the first time that CCFCA is a valuable alternative to covalent CFCA for measuring the active concentration of molecules that recognize ligands not amenable to covalent immobilization. The capture approach also increases throughput analysis and reduces sensor chips consumption. Indeed, the concentration and the binding

kinetics of multiple analyte-ligand complexes can be determined on one flow cell of one sensor chip.

Acknowledgments

This work has benefited from a grant given by Astellas Pharma France and a funding obtained from the French Agence de la Biomedecine (call for projects 2015). The funders had no role in work design and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank the structural biophysico-chemistry facility (UMS 3033/US001) of the Institut Européen de Chimie et Biologie (Pessac, France) for access to the Biacore T200 instrument that was acquired with the support of the Conseil Régional d'Aquitaine, the GIS-IBiSA, and the Cellule Hôtels à Projets of the CNRS.

References

- [1]. Jonsson U, Fagerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, et al. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*. 1991 Nov;11(5):620-7.
- [2]. Fagerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Ronnberg I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr*. 1992 Apr 24;597(1-2):397-410.
- [3]. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Chatellier J, Christensen L, Rauffer-Bruyere N, Richalet-Secordel P, et al. Measurement of antigen-antibody interactions with biosensors. *J Mol Recognit*. 1998 Winter;11(1-6):163-7.
- [4]. Hearty S, Leonard P, O'Kennedy R. Measuring antibody-antigen binding kinetics using surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol*. 2012;907:411-42.
- [5]. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods*. 1991 Dec 15;145(1-2):229-40.
- [6]. Morton TA, Myszka DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol*. 1998;295:268-94.
- [7]. Christensen LL. Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem*. 1997 Jul 1;249(2):153-64.
- [8]. Richalet-Secordel PM, Rauffer-Bruyere N, Christensen LL, Ofenloch-Haehnle B, Seidel C, Van Regenmortel MH. Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem*. 1997 Jul 1;249(2):165-73.

- [9]. Pol E, Karlsson R, Roos H, Jansson A, Xu B, Larsson A, et al. Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. *J Mol Recognit*. 2007 Jan-Feb;20(1):22-31.
- [10]. Pol E. The importance of correct protein concentration for kinetics and affinity determination in structure-function analysis. *J Vis Exp*. 2010(37).
- [11]. Bodmer WF. The HLA system: structure and function. *J Clin Pathol*. 1987 Sep;40(9):948-58.
- [12]. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, et al. Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant*. 2006 Oct;6(10):2307-15.
- [13]. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am J Transplant*. 2011 Apr;11(4):719-24.
- [14]. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009 May 27;87(10):1505-13.
- [15]. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug;21(8):1398-406.
- [16]. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol*. 1999 Dec;60(12):1293-302.
- [17]. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation*. 2003 Jan 15;75(1):43-9.

- [18]. El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol*. 2005 Sep;66(9):989-97.
- [19]. Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Mar 24.
- [20]. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation*. 2014 Oct 15;98(7):738-44.
- [21]. Visentin J, Guidicelli G, Moreau JF, Lee JH, Taupin JL. Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation. *Eur J Immunol*. 2015 Mar 30.
- [22]. Myszka DG. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit*. 1999 Sep-Oct;12(5):279-84.
- [23]. Di Primo C. Real time analysis of the RNAI-RNAII-Rop complex by surface plasmon resonance: from a decaying surface to a standard kinetic analysis. *J Mol Recognit*. 2008 Jan-Feb;21(1):37-45.
- [24]. Palau W, Di Primo C. Single-cycle kinetic analysis of ternary DNA complexes by surface plasmon resonance on a decaying surface. *Biochimie*. 2012 Sep;94(9):1891-9.
- [25]. Karlsson R, Katsamba PS, Nordin H, Pol E, Myszka DG. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*. 2006 Feb 1;349(1):136-47.
- [26]. Visentin J, Marroc M, Guidicelli G, Bachelet T, Nong T, Moreau JF, et al. Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2015 Feb 13.

Tables

Table 1: Active concentration of HLA-B*44:02 measured by covalent CFCA and capture CFCA.

	Covalent CFCA		Capture CFCA		Protein ^d
	Active concentration ^a	QC ^c	Active concentration	QC ratio	concentration
	\pm SD ^b (nM)	ratio fit	\pm SD (nM)	fit	(nM)
Solution #1					
HLA-B*44:02	15.00 \pm 0.03	0.439	17.00 \pm 0.03	0.313	
					49
Solution #2					
HLA-B*44:02	15.00 \pm 0.04	0.438	14.00 \pm 0.07	0.361	

^aConcentration of the working solution measured with CFCA, ^bStandard deviation, ^cThe QC ratio is the quotient Q reflecting the degree of mass transport limitation (Materials and Methods Equation 2). ^dProtein concentration of the working solution calculated from the stock solution, determined with the acid bincinchoninic assay.

Table 2: Active concentration of W6/32 antibody measured by capture CFCA.

Captured HLA alleles	Solution #1		Solution #2		Protein ^d concentration (nM)
	Active concentration ^a ± SD ^b (nM)	QC ^c ratio fit	Active concentration ± SD (nM)	QC ratio fit	
HLA-A*02:01	2.80 ± 0.01	0.225	2.60 ± 0.02	0.242	6.7
HLA-A*11:01	2.70 ± 0.01	0.263	3.20 ± 0.03	0.200	
HLA-B*44:02	2.50 ± 0.02	0.237	2.70 ± 0.02	0.226	

^aConcentration of the working solution measured with CFCA, ^bStandard deviation, ^cThe QC ratio is the quotient Q reflecting the degree of mass transport limitation (Materials and Methods Equation 2). ^dProtein concentration of the working solution calculated from the stock solution, determined with a spectrophotometer (UV).

Table 3: Rate and equilibrium constants for W6/32 binding to captured HLA molecules.

Captured HLA alleles	$k_a \pm \text{SD}^a$ ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$k_d \pm \text{SD}$ ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)	$K_D \pm \text{SD}$ ($\times 10^{-11} \text{ M}$)
HLA-A*02:01	1.4 ± 0.1	0.98 ± 0.15	7.0 ± 1.4
HLA-A*11:01	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.4	7.5 ± 1.8
HLA-B*44:02	2.2 ± 0.2	1.6 ± 1.1	7.1 ± 4.3

^aStandard deviation

Figures legends

Figure 1: Strategies used for capture CFCA validation and application to class I HLA antibodies. Strategy #1 corresponds to a covalent CFCA whereas strategies #2 and #3 to capture CFCAs.

Figure 2: Capture CFCA validation. A) Covalent CFCA sensorgrams using an immobilized mouse anti-B2m mAb. B) Sensorgrams corresponding to the capture CFCA experiment in its entirety. The first, second and third arrows (from left to right) indicate the injection, over the immobilized rat anti-mouse IgG2a mAb, of the anti-B2m mAb, the HLA-B*44:02 solution and the regeneration step, respectively. C) Capture CFCA sensorgrams using an immobilized rat anti-mouse IgG2a mAb which was used to capture anti-B2m mAb.

Figure 3: Capture CFCA of the class I HLA antibody W6/32. Capture CFCA sensorgrams of W6/32 using an immobilized anti-B2m mAb to capture three different HLA molecules: HLA-A*02:01 (A), HLA-A*11:01 (B) and HLA-B*44:02 (C).

Figure 4: Flexibility of the capture CFCA method. A) Active concentrations of HLA-A*02:01 measured with capture CFCA (CCFCA) using an immobilized rat anti-mouse IgG2a mAb onto which different levels of anti-B2m mAb were captured. B) Active concentrations of W6/32 mAb measured with CCFCA using an immobilized anti-B2m on which different levels of HLA-A*02:01 were captured. Black squares indicate the active concentrations measured by CCFCA, dashed line indicates the active concentration measured by covalent CFCA [only for (A)], and white circles indicate the QC ratio value.

Figure 5: Capture Single Cycle Kinetics of a class I HLA antibody. Capture SCK sensorgrams using an immobilized anti-B2m mAb to capture three different HLA molecules, HLA-A*02:01 (A), HLA-A*11:01 (B) and HLA-B*44:02 (C). W6/32 was injected at three increasing concentrations without any regeneration step between the injections.

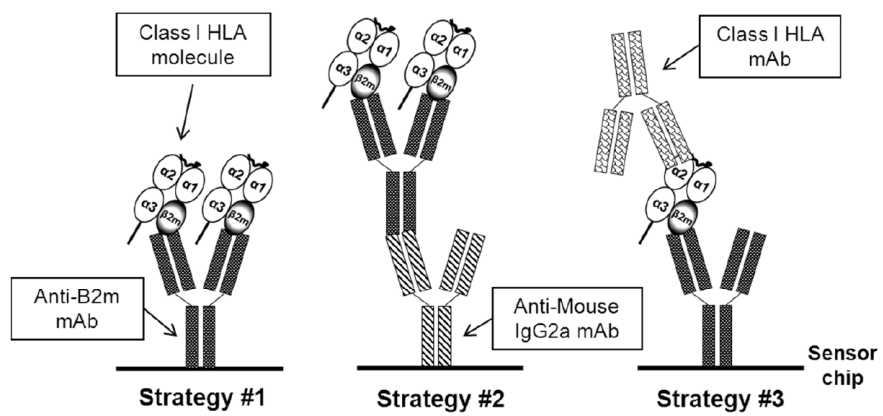


Figure 1

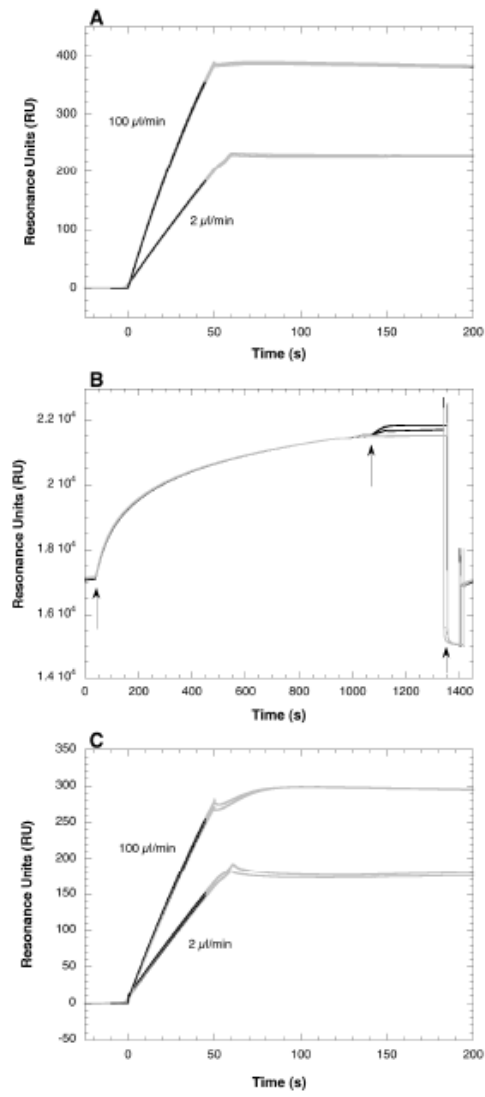


Figure 2

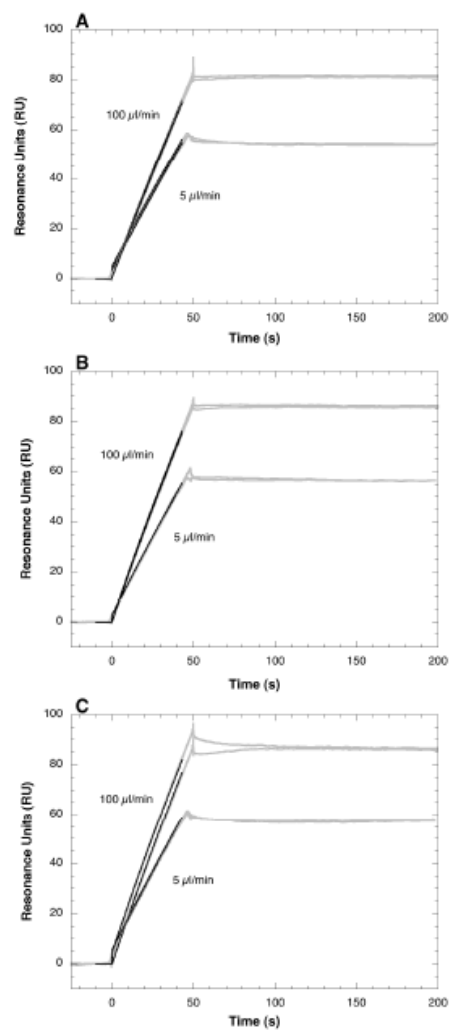


Figure 3

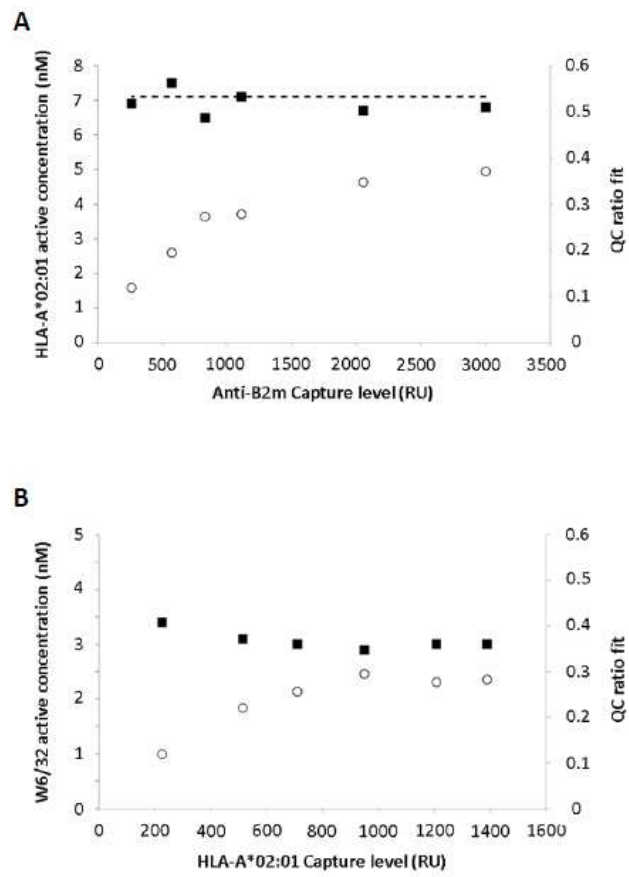


Figure 4

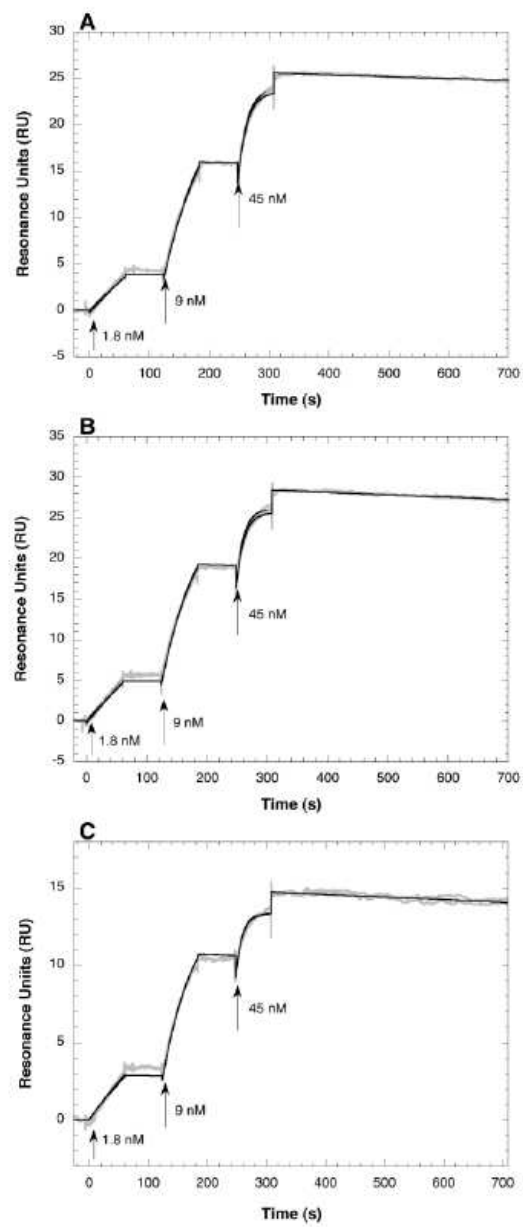


Figure 5

Supporting information

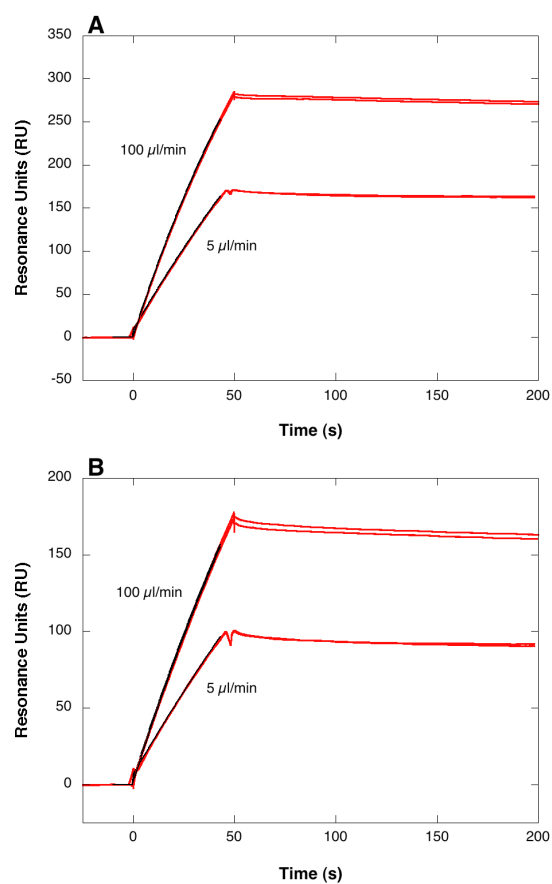


Figure S-1: Direct CFCA of HLA-A*02:01 and A*11:01 solutions. Direct calibration free concentration analysis (CFCA) sensorgrams of HLA-A*02:01 (A) and HLA-A*11:01 (B) solutions using high amount of mouse anti-B2m monoclonal antibody immobilized on a CM5 sensor chip.

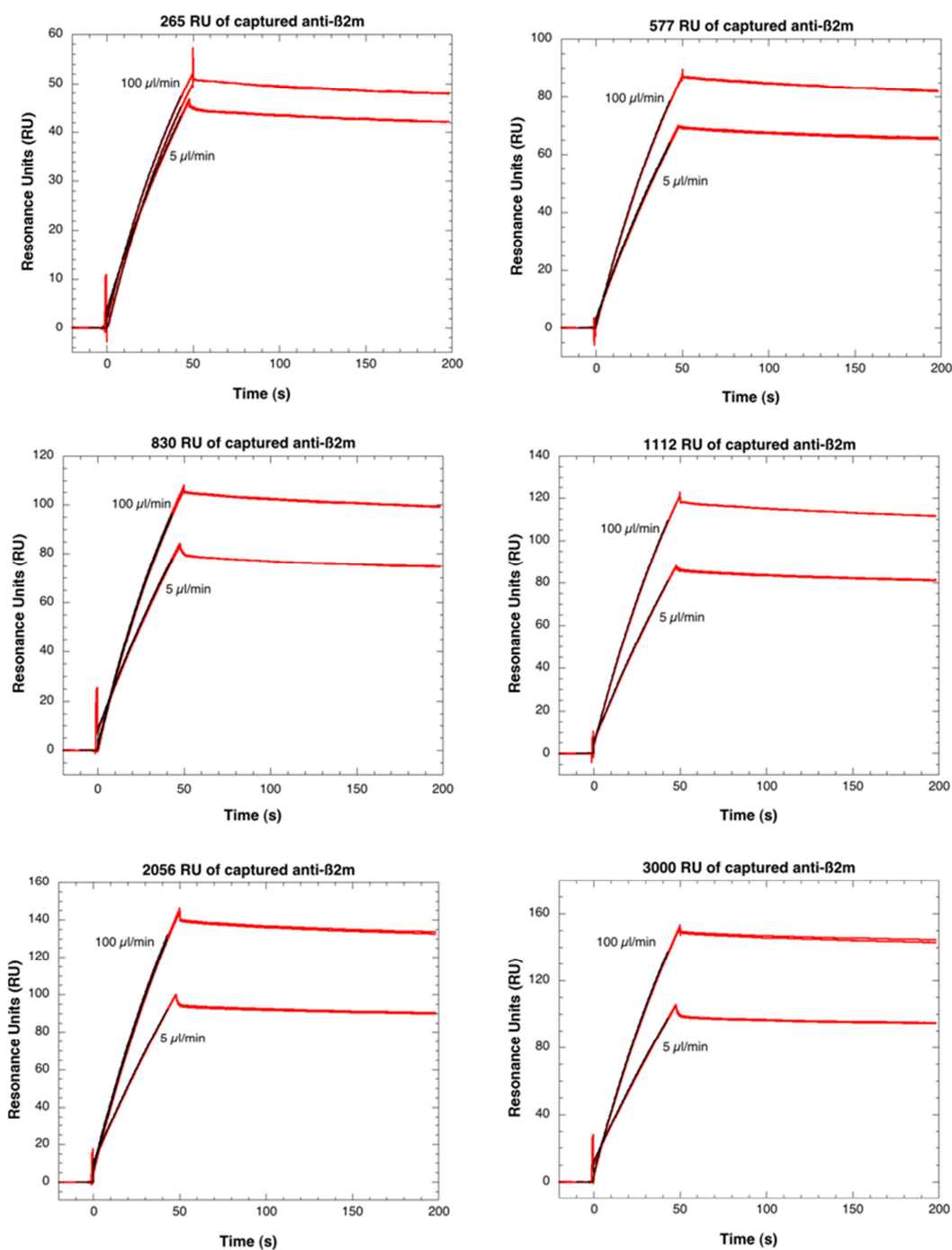


Figure S-2: Capture CFCA of HLA A*02:01 with different capture levels. Capture calibration free concentration analysis (CFCA) sensorgrams of a HLA-A*02:01 solution using an immobilized rat anti-mouse IgG2a mAb on which different levels of anti-B2m mAb were captured.

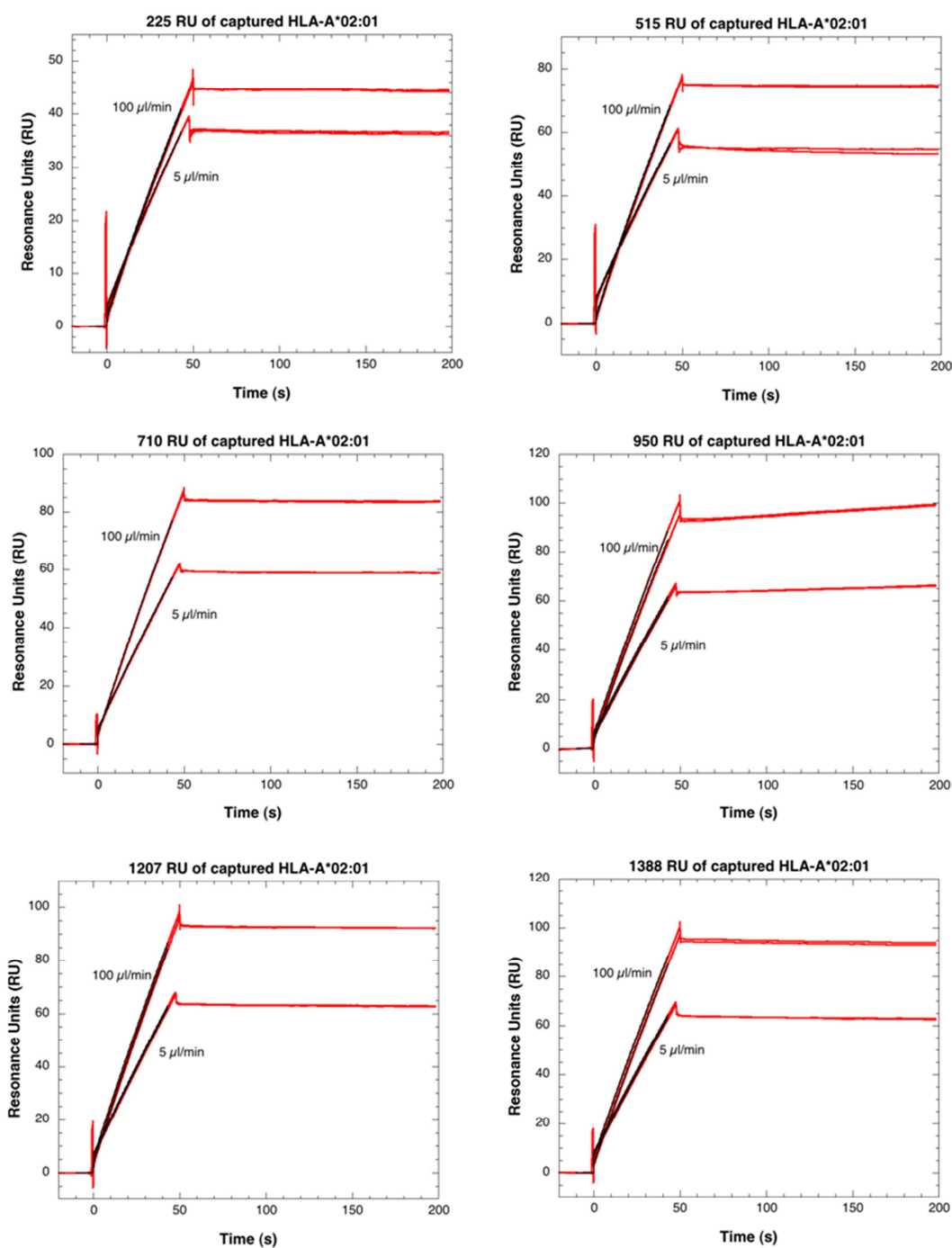


Figure S-3: Capture CFCA of W6/32 mAb with different capture levels. Capture calibration free concentration analysis (CFCA) sensorgrams of a W6/32 mAb solution using an immobilized anti-B2m on which different levels of HLA-A*02:01 were captured.

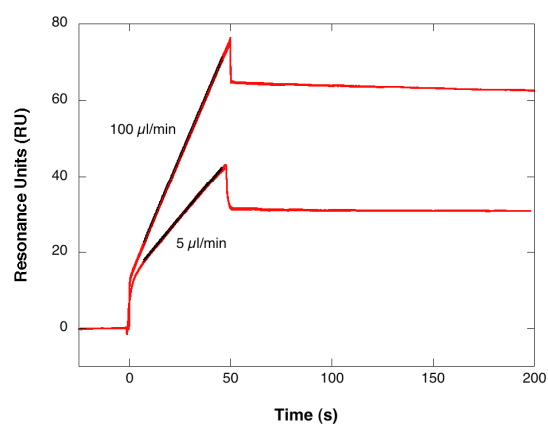


Figure S-4: Direct CFCA on a CM7 sensorchip. Direct calibration free concentration analysis (CFCA) sensorgrams using high amount of mouse anti-B2m monoclonal antibody immobilized on a CM7 sensor chip, on which a HLA-B*44:02 solution was injected at 5 and 100 µl/min flow rates.

Table S-1: Capture CFCA of HLA A*02:01 with different capture levels.

	Covalent CFCA			Capture CFCA			
Capture level (RU)	NA	3000	2056	1112	830	577	265
Active concentration	7.10	6.80	6.70	7.10	6.50	7.50	6.90
± SD ^a (nM)	± 0.05	± 0.06	± 0.05	± 0.03	± 0.16	± 0.02	± 0.4
QC ratio fit ^b	0.402	0.371	0.348	0.279	0.273	0.195	0.119

^aStandard deviation, ^bThe QC ratio is the quotient Q reflecting the degree of mass transport limitation (Materials and Methods Equation 2).

Table S-2: Capture CFCA of W6/32 mAb with different capture levels.

	Capture CFCA					
Capture level (RU)	1388	1207	950	710	515	225
Active concentration \pm SD ^a (nM)	3.00 \pm 0.03	3.00 \pm 0.03	2.90 \pm 0.03	3.00 \pm 0.02	3.10 \pm 0.07	3.40 \pm 0.15
QC ratio fit ^b	0.282	0.277	0.295	0.256	0.221	0.119

^aStandard deviation, ^bThe QC ratio is the quotient Q reflecting the degree of mass transport limitation (Materials and Methods Equation 2).

VIII-3 – Interaction des anticorps anti-HLA avec le greffon - Discussion des résultats

Notre travail sur les DSA intra-greffon en transplantation pulmonaire est le premier du genre pour cet organe. La présence de DSA intra-greffon est une preuve formelle de l'interaction des DSA avec le greffon, il paraît donc logique que ce paramètre soit un critère pronostique de perte du greffon. Celui-ci ne devrait pas être sujet aux interférences positives, c'est-à-dire qu'un anti-dHLA détecté dans un éluat de biopsie pourra avoir une significativité clinique à partir du moment où il interagit avec le greffon. Concernant les interférences négatives, des DSA d'isotype IgM pourraient être éluées en même temps que des DSA d'isotype IgG et entrer en compétition avec elles, mais celles-ci ne pourraient interférer via l'activation du complément à la surface des billes. En effet, l'éluat n'est pas censé contenir du complément fonctionnel, à l'opposé du sérum et des liquides interstitiels. Enfin, nous ne savons pas si l'activation du complément *in vivo* entraîne un dépôt de fragments de C4 et C3 sur les DSA et donc gêne leur détection. Néanmoins, nos précédents travaux en transplantation rénale et hépatique ont montré qu'il était possible de détecter des gDSA chez des patients C4d+ en histologie. Par ailleurs, au-delà des propriétés du DSA, sa présence dans le greffon témoigne également de l'expression de son antigène cible au sein du greffon, à un endroit où il est accessible aux anticorps. Ceci est particulièrement important quant à la signification clinique des anticorps anti-HLA-C, -DQ, chaîne alpha du DQ et -DP, retrouvés dans les éluats de biopsie, qui n'ont jusqu'à présent pas bénéficié de la même considération que les anticorps anti-HLA-A, -B et -DR, certainement à tort.

La détection des gDSA pourrait également devenir un critère diagnostique de rejet à médiation humorale et être d'une aide cruciale pour les transplantateurs pulmonaires qui manquent cruellement de critères histologiques spécifiques pour définir ce type de rejet. Il est important de noter que notre étude possède un certain nombre de limites, notamment son caractère rétrospectif, la petite taille de l'effectif étudié et le fait que la plupart des patients avaient une fonction respiratoire déjà très altérée. Une étude prospective permettrait de confirmer nos résultats et d'évaluer l'intérêt de la détection des gDSA dans les formes précoces de rejet humoral.

Par ailleurs, la plupart des gDSA, à une exception près, étaient également présents dans le sérum, et les DSA de forte MFI étaient plus fréquemment retrouvés, comme précédemment décrit en transplantation rénale (370). La taille du fragment élué pourrait également moduler la capacité à détecter les gDSA. Au final, même s'il reste à déterminer quels sont les facteurs techniques (taille de la biopsie, efficacité de l'élution, MFI dans le sérum, localisation de la biopsie au sein du greffon) influençant la détection des gDSA, le fait qu'il soit possible de retrouver des DSA de faible MFI, voire non détectés dans le sérum, et de ne pas détecter des DSA de forte MFI, pourrait indiquer que ceux-ci possèdent des propriétés particulières. En effet, une forte affinité leur permettrait de rester durablement fixés au greffon et pourraient leur procurer une pathogénicité accrue. C'est ce que nous voulions mesurer à l'aide de la SPR.

Notre travail sur la CFCA capture est le premier du genre décrivant la possibilité de déterminer la concentration active puis l'affinité d'un anticorps anti-HLA à l'aide de la SPR. Les difficultés rencontrées lors de l'utilisation des molécules HLA en tant que ligand nous ont conduits à valider la CFCA en mode capture et à mettre en avant ses avantages. Ceux-ci pourront bien entendu être mis à profit pour d'autres applications que la nôtre. C'est pour cette raison que nous avons soumis notre travail à un journal généraliste tel que *Talanta*.

Cependant, nous anticipons le fait que la CFCA capture puisse posséder un certain nombre d'inconvénients, plus particulièrement lors de l'utilisation d'échantillons complexes tels que le sérum humain.

Premièrement, l'ancre immobilisée de manière covalente sur la surface ne doit pas entrer en compétition avec l'analyte HLA. Dans notre cadre, l'anticorps monoclonal utilisé pour la capture devra donc reconnaître un épitope suffisamment éloigné de celui reconnu par l'anticorps à étudier. Nous avons mis en évidence ce genre de situation dans l'article décrivant l'interférence liée aux IgM. Lors de l'étude d'un anticorps monoclonal, la vérification de l'absence de compétition est alors relativement simple. En revanche, si nous utilisons cette technique à partir de mélanges d'anticorps anti-HLA, comme cela sera le cas dans le sérum des patients, une étude préalable de la compétition réalisée en SAG sera certainement nécessaire.

Deuxièmement, l'ancre immobilisée de manière covalente sur la surface ne doit pas générer d'interaction non spécifique avec les composants de l'échantillon, qu'ils soient l'analyte lui-même ou d'autres éléments. Encore une fois cela est relativement facile à vérifier et peu probable dans le cas d'un anticorps monoclonal dilué dans du tampon de course. En revanche, à partir d'un échantillon complexe tel que du sérum de patient, un certain nombre de composés pourrait générer du « NSB ». En effet, les premiers tests d'injection de sérums non prétraités en provenance de patients ont montré un niveau de NSB très fort sur une piste ne présentant que l'anti-B2M immobilisé (6 sérums de patients injectés pendant 60 secondes à 25 μ l/min sur 18460 RU d'anti-B2M : 1680 +/- 317 RU si dilués au 1/10^{ème}, 399 +/- 157 si dilués au 1/100^{ème}). Nous avons réalisé un grand nombre de tests afin de régler ce problème technique et au bout de deux ans de travail, nous pensons avoir trouvé la solution qui fait actuellement l'objet d'une démarche de protection par un brevet.

Troisièmement, la complexité de l'échantillon peut compliquer l'interprétation des résultats. Concernant la CFCA, tous les calculs sont basés sur le coefficient de diffusion de l'analyte. Les différentes sous-classes d'IgG ne possèdent pas le même poids moléculaire, notamment les IgG3 qui sont plus massives. Cette variation est cependant négligeable quant à son impact sur le coefficient de diffusion qui correspond au produit d'une constante avec l'inverse de la racine cubique du poids moléculaire. En revanche, la différence de poids moléculaire entre une IgG et une IgM est majeure, aussi nous devons en tenir compte lors de l'étude du sérum de nos patients.

Un autre aspect est la vitesse d'association des différents anticorps présents dans l'échantillon : dans le cas d'un mélange d'analytes, la pente du sensorgramme pendant la phase d'association sera majoritairement représentative de l'anticorps qui s'associe le plus rapidement et la concentration mesurée en CFCA sera plus proche de celle correspondant à cet anticorps et ne sera qu'une concentration « apparente » (32). Dans le cadre de la transplantation, il est fort probable que le sérum des patients renferme un mélange hétérogène d'anticorps anti-HLA de différentes concentrations et différentes affinités, en raison des divers processus de maturation des anticorps évoqués dans l'introduction et aussi parce qu'un patient peut avoir plusieurs anticorps anti-HLA reconnaissant la même molécule HLA via différents épitopes. Nous n'avons encore aucune idée de la largeur du spectre des constantes d'association présentées par les anticorps anti-HLA des patients ni de l'impact que cela aura sur les résultats de la CFCA.

Enfin, lors des études cinétiques, un mélange complexe d'anticorps ne permet pas d'utiliser les modèles classiques d'interaction 1:1. Nous devons alors certainement utiliser

des modèles plus complexes comme cela a été proposé (40). Il est également envisageable que des paramètres plus « grossiers », tels que la concentration « apparente » et/ou un score d'avidité, ce dernier correspondant au rapport de la quantité d'anticorps liée au ligand divisée par la vitesse de dissociation (36), soient des indicateurs de pathogénicité des anticorps anti-HLA.

IX - PERSPECTIVES

Notre travail sur les anti-dHLA, ajouté à celui des autres équipes ayant publié sur le sujet, est actuellement utilisé par les sociétés savantes francophones, la SFHI (Société Francophone d'Histocompatibilité et Immunogénétique) et la SFT (Société Francophone de Transplantation), pour l'établissement de recommandations décrivant les modalités de la recherche et de la prise en compte de ces anticorps pour l'activité de routine hospitalière de suivi des patients en attente de greffe et transplantés. En raison du surcoût occasionné par le traitement acide des billes, il sera recommandé d'utiliser ce test dans des cas bien précis en situation pré-greffe : patients immunisés anti-HLA de classe I mais dépourvus d'évènement immunisant, notamment pour lesquels les spécificités positives risquent de diminuer significativement l'accès à la greffe, projet de greffe avec donneur vivant, plus particulièrement parce que l'on peut facilement réaliser un XM CMF. Ceci sera d'autant plus important en transplantation d'organes thoraciques pour lesquels le refus abusif d'un greffon peut avoir des conséquences dramatiques.

Par ailleurs, dans nos différentes études, très peu d'anti-HLA dirigés contre les molécules HLA-Cw ont pu être étudiés en XM CMF, alors même que les anti-dHLA reconnaissent de manière très fréquente les antigènes HLA-Cw. En effet, l'époque où nous avons réalisé cette étude, le typage HLA-Cw n'était pas réalisé en systématique pour nos donneurs locaux. Depuis l'été 2014, nous utilisons une nouvelle technique de typage pour les patients en état de mort encéphalique pouvant devenir des donneurs d'organes. C'est aussi une technique classique de SSP (*sequence-specific primers*) mais à révélation par courbes de fusion dans une plaque de 384 puits (LinkSeq[®], Linkage Biosciences Inc.). Le nombre plus élevé de réactions de PCR permet d'obtenir le typage HLA-Cw (et des autres loci jusqu'alors non déterminés en urgence) de tous nos donneurs locaux. Nous planifions alors de reprendre les tests en XM CMF afin de tirer au clair la signification clinique des anti-dHLA anti-Cw. A ce travail s'ajoutera un élargissement de notre étude rétrospective sur l'issue clinique des patients transplantés avec des anti-dHLA anti-Cw préformés à travers la collaboration avec les centres de transplantation rénale de Paris et Toulouse.

Enfin, les iBeads[®] ne sont plus commercialisées par One Lambda, Inc., certainement parce que les études démontrant leur possible utilisation n'ont été que très rares et ont mis du temps à être publiées. Nous espérons que nos travaux permettront de relancer la chaîne de production puis leur utilisation en clinique, leur utilisation pouvant grandement faciliter la manière d'appréhender les anti-dHLA.

Notre travail sur l'interférence liée à l'activation du complément, ajouté à celui des autres équipes ayant publié sur le sujet, est également utilisé par la SFHI et la SFT pour l'établissement de recommandations techniques quant à la nécessité d'éliminer cette interférence par un traitement systématique des sérums. Une question essentielle est de savoir quel traitement entre chaleur, EDTA et DTT est le mieux adapté. Une comparaison systématique de ces trois traitements devra être faite et est censée constituer le travail d'un groupe interne à la SFHI. Dans l'intervalle, nous avons réalisé une étude relative à l'utilisation systématique du traitement EDTA en routine hospitalière (Guidicelli *et al*, article en cours de rédaction). Il semble que son utilisation ne fasse pas l'objet de problèmes particuliers et nous l'utilisons depuis début 2013.

Notre travail sur l'interférence liée aux IgM remet en question nos pratiques, le traitement EDTA ne permettant pas de s'affranchir totalement de ce problème. Néanmoins, l'interférence liée aux IgM indépendante du complément semble beaucoup moins fréquente et moins dramatique que celle liée à l'activation du complément par les IgG. Nous prévoyons par ailleurs d'explorer la prévalence des IgM au sein d'une large cohorte de patients, ceci nous permettra de mieux évaluer l'impact de cette interférence et orienter notre conduite à tenir.

Une autre question importante est de savoir si la correction de ces interférences négatives permet de mieux anticiper l'évolution des patients ayant des DSA en se basant uniquement sur la MFI obtenue en SAG, réduisant nettement l'intérêt et l'engouement actuels suscités par les tests C1q et C3d. Nous sommes actuellement en train d'étudier ces trois paramètres dans une cohorte de transplantés rénaux du CHU de Bordeaux ayant eu une biopsie sur indication, en y joignant du même coup la recherche des DSA *in situ* par élution des biopsies (Courant M.*, Visentin J.* *et al*, article en cours de rédaction, *contribution au travail équivalente).

La détection des DSA dans les éluats de biopsies est un moyen de d'assurer que ceux-ci interagissent bien avec le greffon, que ce soit avec des antigènes HLA dénaturés ou non, et cette technique ne devrait pas être sensible à l'interférence liée à l'activation du complément mais peut-être à celle liée aux IgM, dans sa partie non liée au complément. Il nous reste cependant à approfondir nos connaissances concernant ce nouvel outil diagnostique sur le versant technique (MFI des DSA, taille optimale des biopsies, localisation des biopsies...).

Enfin, nous sommes justes au commencement de l'utilisation de la SPR pour l'étude des anticorps anti-HLA. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il est possible de déterminer l'affinité des anticorps anti-HLA, mais nous sommes encore loin d'une utilisation de cette technique en routine. Il nous reste à démontrer la faisabilité à partir d'autres anticorps monoclonaux (collaboration en cours avec le Pr Xavier Saulquin, Université de Nantes, et les Dr Arend Mulder et Pr Frans Claas, Université de Leiden) puis d'échantillons de sérums de patients, et la réelle implication des paramètres cinétiques dans la pathogénicité des anticorps anti-HLA.

Nous prévoyons dans un premier temps de mettre en relation les résultats obtenus en SPR avec ceux de l'étude des gDSA en transplantation rénale et pulmonaire. En effet, il est possible que la capacité d'un anticorps à être retrouvé au niveau des biopsies de greffon dépende de son affinité pour sa cible HLA. Par ailleurs, la SPR pourrait être utilisée afin de confirmer le fait qu'un anticorps anti-HLA de classe I soit un anti-nHLA et pas un anti-dHLA, la capture par un anti-B2M ne permettant, *a priori*, que de capturer des molécules HLA natives.

La SPR pourra également être utilisée dans une approche plus qualitative afin d'étudier la capacité des anticorps anti-HLA à activer le complément en fonction de la position sur l'antigène des épitopes reconnus et d'une éventuelle synergie entre des anticorps reconnaissant des épitopes différents. Par ailleurs, nous pourrions évaluer l'activation du complément et la signalisation intracellulaire générées par des anticorps, pour lesquels une caractérisation précise de la concentration active et des paramètres cinétiques a été effectuée, dans des modèles *in vitro* de cellules endothéliales. Enfin, il est possible que l'accès des anticorps aux molécules HLA soit différent entre la surface d'une puce de SPR, d'une cellule ou de billes SAG, en raison de l'environnement (dextran pour la SPR, glycocalyx et protéines de membranes à la surface des cellules) qui les entoure. Encore une fois, l'utilisation

d'anticorps anti-HLA parfaitement caractérisés en SPR pourrait nous permettre d'apprécier l'existence de ces différences et leur impact au niveau physiopathologique et diagnostique.

X - CONCLUSION

Nous avons concentré nos travaux d'une part sur la compréhension de facteurs pouvant expliquer l'association imparfaite entre les évènements cliniques et la MFI des DSA détectés en SAG, d'autre part sur l'utilisation de deux nouvelles approches qui pourraient permettre de mieux comprendre la pathogénicité des anticorps anti-HLA. Ces derniers constituent actuellement le principal problème en transplantation d'organes solides et nous espérons que la poursuite de ces projets permettra de répondre à une partie des nombreuses questions que l'on se pose encore à leur sujet.

XI - BIBLIOGRAPHIE

1. Porter RR. The structure of the heavy chain of immunoglobulin and its relevance to the nature of the antibody-combining site. The Second CIBA Medal Lecture. *Biochem J.* 1967 Nov;105(2):417-26.
2. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52.
3. Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP, Saul F. Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Dec;70(12):3305-10.
4. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1987 Aug 20;196(4):901-17.
5. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature.* 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83.
6. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1997 Nov 7;273(4):927-48.
7. Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, Krogsgaard M, Ott RG, Shukair S, et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. *Nature.* 2010 Sep 30;467(7315):591-5.
8. MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol.* 1996 Oct 11;262(5):732-45.
9. Colman PM. Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol.* 1988;43:99-132.
10. Laver WG, Air GM, Webster RG, Smith-Gill SJ. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell.* 1990 May 18;61(4):553-6.
11. Novotny J. Protein antigenicity: a thermodynamic approach. *Mol Immunol.* 1991 Mar;28(3):201-7.
12. Laune D, Molina F, Ferrieres G, Mani JC, Cohen P, Simon D, et al. Systematic exploration of the antigen binding activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):30937-44.
13. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 1983 Apr 14;302(5909):575-81.
14. Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, Hood L, Alt FW. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell.* 1986 Jan 31;44(2):251-9.
15. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science.* 1987 Nov 20;238(4830):1079-87.
16. Alt FW, Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jul;79(13):4118-22.
17. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity.* 1996 Feb;4(2):107-11.
18. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):22-33.
19. Eisen HN, Siskind GW. Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response. *Biochemistry.* 1964 Jul;3:996-1008.
20. Getzoff ED, Tainer JA, Lerner RA, Geysen HM. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv Immunol.* 1988;43:1-98.

21. Van Regenmortel MH. Reductionism and the search for structure-function relationships in antibody molecules. *J Mol Recognit*. 2002 Sep-Oct;15(5):240-7.
22. Helmerhorst E, Chandler DJ, Nussio M, Mamotte CD. Real-time and Label-free Biosensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective. *Clin Biochem Rev*. 2012 Nov;33(4):161-73.
23. Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B. Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys J*. 1998 Aug;75(2):583-94.
24. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Chatellier J, Christensen L, Rauffer-Bruyere N, Richalet-Secordel P, et al. Measurement of antigen-antibody interactions with biosensors. *J Mol Recognit*. 1998 Winter;11(1-6):163-7.
25. Hearty S, Leonard P, O'Kennedy R. Measuring antibody-antigen binding kinetics using surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol*. 2012;907:411-42.
26. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods*. 1991 Dec 15;145(1-2):229-40.
27. Morton TA, Myszka DG. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol*. 1998;295:268-94.
28. Karlsson R, Katsamba PS, Nordin H, Pol E, Myszka DG. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*. 2006 Feb 1;349(1):136-47.
29. Palau W, Di Primo C. Single-cycle kinetic analysis of ternary DNA complexes by surface plasmon resonance on a decaying surface. *Biochimie*. 2012 Sep;94(9):1891-9.
30. Pol E. The importance of correct protein concentration for kinetics and affinity determination in structure-function analysis. *J Vis Exp*. 2010(37).
31. Aubailly L, Drucbert AS, Danze PM, Forzy G. Comparison of surface plasmon resonance transferrin quantification with a common immunoturbidimetric method. *Clin Biochem*. 2011 Jun;44(8-9):731-5.
32. Christensen LL. Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem*. 1997 Jul 1;249(2):153-64.
33. Richalet-Secordel PM, Rauffer-Bruyere N, Christensen LL, Ofenloch-Haehnle B, Seidel C, Van Regenmortel MH. Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal Biochem*. 1997 Jul 1;249(2):165-73.
34. Myszka DG. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit*. 1999 Sep-Oct;12(5):279-84.
35. Moberg A, Lager A, Hamalainen MD, Jarhede T. Increased sensitivity of SPR assays in plasma through efficient parallel assay optimization. *J Pharm Biomed Anal*. 2013 May 5;78-79:224-32.
36. Lynch HE, Stewart SM, Kepler TB, Sempowski GD, Alam SM. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen. *J Immunol Methods*. 2014 Feb;404:1-12.
37. DiGiacomo RA, Xie L, Cullen C, Indelicato SR. Development and validation of a kinetic assay for analysis of anti-human interleukin-5 monoclonal antibody (SCH 55700) and human interleukin-5 interactions using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*. 2004 Apr 15;327(2):165-75.
38. Pabbisetty KB, Yue X, Li C, Himanen JP, Zhou R, Nikolov DB, et al. Kinetic analysis of the binding of monomeric and dimeric ephrins to Eph receptors: correlation to function in a growth cone collapse assay. *Protein Sci*. 2007 Mar;16(3):355-61.

39. Tiwari PB, Uren A, He J, Darici Y, Wang X. Note: Model identification and analysis of bivalent analyte surface plasmon resonance data. *Rev Sci Instrum.* 2015 Oct;86(10):106107.
40. Altschuh D, Bjorkelund H, Strandgard J, Choulier L, Malmqvist M, Andersson K. Deciphering complex protein interaction kinetics using Interaction Map. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Nov 9;428(1):74-9.
41. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):34-47.
42. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol.* 2009 May;157(2):220-33.
43. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
44. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science.* 2014 Mar 14;343(6176):1260-3.
45. Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):1287-95.
46. Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology.* 2002 Jan;105(1):9-19.
47. Lucisano Valim YM, Lachmann PJ. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol.* 1991 Apr;84(1):1-8.
48. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000 Sep 1;102(5):553-63.
49. Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):48-58.
50. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature.* 1988 Apr 21;332(6166):738-40.
51. Stites E, Le Quintrec M, Thurman JM. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. *J Immunol.* 2015 Dec 15;195(12):5525-31.
52. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol.* 2004 Dec;138(3):439-46.
53. Gorer PA, Schutze H. Genetical studies on immunity in mice: II. Correlation between antibody formation and resistance. *J Hyg (Lond).* 1938 Nov;38(6):647-62.
54. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948 Oct;49(2):87-108.
55. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* 1958 Jul-Oct;20(1-4):156-66.
56. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet.* 2008 Jun;35(3):179-92.
57. van Oosterhout C. A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proc Biol Sci.* 2009 Feb 22;276(1657):657-65.
58. Lahat N, Bitterman H, Weiss-Cerem L, Rahat MA. Hypoxia increases membranous and secreted HLA-DR in endothelial cells, rendering them T-cell activators. *Transpl Int.* 2011 Oct;24(10):1018-26.
59. Steiniger B, van der Meide PH, Westermann J, Klempnauer J. Systemic induction of class II MHC antigens after continuous intravenous infusion of recombinant gamma interferon in rats. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19(5):4322-4.

60. Gibbs VC, Wood DM, Garovoy MR. The response of cultured human kidney capillary endothelium to immunologic stimuli. *Hum Immunol.* 1985 Nov;14(3):259-69.
61. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK. Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol.* 2003 May;14(5):1336-48.
62. Michelson S. Human cytomegalovirus escape from immune detection. *Intervirol.* 1999;42(5-6):301-7.
63. Garrido F, Algarra I, Garcia-Lora AM. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Oct;59(10):1601-6.
64. Johnson DR. Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol.* 2000 Apr;61(4):389-96.
65. Rene C, Lozano C, Villalba M, Eliaou JF. 5' and 3' untranslated regions contribute to the differential expression of specific HLA-A alleles. *Eur J Immunol.* 2015 Sep 24.
66. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:359-93.
67. Lanier LL. Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol.* 1998;452:13-8.
68. van Hooff JP, van der Steen GJ, Schippers HM, van Rood JJ. Efficacy of HL-A matching in Eurotransplant. *Lancet.* 1972 Dec 30;2(7792):1385-8.
69. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet.* 1999;1(3):334-42.
70. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J Immunol.* 2012 Mar 15;188(6):2643-52.
71. Hulsmeier M, Chames P, Hillig RC, Stanfield RL, Held G, Coulie PG, et al. A major histocompatibility complex-peptide-restricted antibody and t cell receptor molecules recognize their target by distinct binding modes: crystal structure of human leukocyte antigen (HLA)-A1-MAGE-A1 in complex with FAB-HYB3. *J Biol Chem.* 2005 Jan 28;280(4):2972-80.
72. Mulder A, Eijnsink C, Kester MG, Franke ME, Kardol MJ, Heemskerk MH, et al. Impact of peptides on the recognition of HLA class I molecules by human HLA antibodies. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5950-7.
73. Schwartz BD, Luehrman LK, Rodey GE. HLA public determinants are target antigens of cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med.* 1980 Aug 1;152(2 Pt 2):340s-50s.
74. Schwartz BD, Luehrman LK, Lee J, Rodey GE. A public antigenic determinant in the HLA-B5 cross-reacting group--a basis for cross-reactivity and a possible link with Behcet's disease. *Hum Immunol.* 1980 Jul;1(1):37-54.
75. Fuller AA, Trevithick JE, Rodey GE, Parham P, Fuller TC. Topographic map of the HLA-A2 CREG epitopes using human alloantibody probes. *Hum Immunol.* 1990 Jul;28(3):284-305.
76. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol.* 2002 May;63(5):339-52.
77. Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. *Hum Immunol.* 2006 Nov;67(11):847-62.
78. Duquesnoy RJ, Marrari M, Jelenik L, Zeevi A, Claas FH, Mulder A. Structural aspects of HLA class I epitopes reacting with human monoclonal antibodies in Ig-binding, C1q-binding and lymphocytotoxicity assays. *Hum Immunol.* 2013 Oct;74(10):1271-9.
79. Duquesnoy RJ. The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself-self discrimination in relation to HLA epitope immunogenicity. *Int J Immunogenet.* 2011 Feb;39(1):1-9.

80. Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008 Oct;20(5):594-601.
81. Kosmoliaptsis V, Chaudhry AN, Sharples LD, Halsall DJ, Dafforn TR, Bradley JA, et al. Predicting HLA class I alloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation*. 2009 Sep 27;88(6):791-8.
82. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis, II, Schreuder GM, Persijn GG, et al. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation*. 2003 Mar 27;75(6):884-9.
83. Dankers MK, Witvliet MD, Roelen DL, de Lange P, Korfage N, Persijn GG, et al. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation*. 2004 Apr 27;77(8):1236-9.
84. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Sharples LD, Chaudhry A, Key T, Goodman RS, et al. Predicting the immunogenicity of human leukocyte antigen class I alloantigens using structural epitope analysis determined by HLAMatchmaker. *Transplantation*. 2008 Jun 27;85(12):1817-25.
85. Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis, II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation*. 2004 Jul 27;78(2):190-3.
86. El-Awar N, Terasaki PI, Cai J, Deng CT, Ozawa M, Nguyen A. Epitopes of the HLA-A, B, C, DR, DQ and MICA antigens. *Clin Transpl*. 2007:175-94.
87. Cai J, Terasaki PI. Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. *Curr Opin Immunol*. 2008 Oct;20(5):602-6.
88. Duquesnoy RJ, Marrari M. Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens. *Tissue Antigens*. 2009 Aug;74(2):117-33.
89. Clatworthy MR, Espeli M, Torpey N, Smith KG. The generation and maintenance of serum alloantibody. *Curr Opin Immunol*. 2010 Oct;22(5):669-81.
90. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, et al. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):264-76.
91. Bajenoff M, Germain RN. B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood*. 2009 Dec 3;114(24):4989-97.
92. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5273-9.
93. Carrasco YR, Batista FD. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):160-71.
94. Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1672-6.
95. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):503-14.
96. Otten HG, Calis JJ, Kesmir C, van Zuilen AD, Spierings E. Predicted indirectly recognizable HLA epitopes presented by HLA-DR correlate with the de novo development of donor-specific HLA IgG antibodies after kidney transplantation. *Hum Immunol*. 2013 Mar;74(3):290-6.

97. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):741-50.
98. Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, et al. TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1004-12.
99. Winter O, Moser K, Mohr E, Zotos D, Kaminski H, Szyska M, et al. Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1867-75.
100. Wehner JR, Fox-Talbot K, Halushka MK, Ellis C, Zachary AA, Baldwin WM, 3rd. B cells and plasma cells in coronaries of chronically rejected cardiac transplants. *Transplantation*. 2010 May 15;89(9):1141-8.
101. Thaunat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y, et al. Chronic rejection triggers the development of an aggressive intra-graft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):717-28.
102. Martin L, Charon-Barra C, Bocrie O, Guignier F, D'Athis P, Dautin G, et al. Detection of plasma cells, C4d deposits and donor-specific antibodies on sequential graft biopsies of renal transplant recipients with chronic dysfunction. *Transpl Immunol*. 2010 Feb;22(3-4):110-4.
103. Thaunat O, Field AC, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch MF, et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14723-8.
104. Snanoudj R, Claas FH, Heidt S, Legendre C, Chatenoud L, Candon S. Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney Int*. 2015 Jun;87(6):1230-40.
105. Mulder A, Eijssink C, Kardol MJ, Franke-van Dijk ME, van der Burg SH, Kester M, et al. Identification, isolation, and culture of HLA-A2-specific B lymphocytes using MHC class I tetramers. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6599-603.
106. Zachary AA, Kopchaliiska D, Montgomery RA, Leffell MS. HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. *Transplantation*. 2007 Apr 15;83(7):982-8.
107. Lucia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015 Oct;88(4):874-87.
108. Lynch RJ, Silva IA, Chen BJ, Punch JD, Cascalho M, Platt JL. Cryptic B cell response to renal transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Jul;13(7):1713-23.
109. Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood*. 1996 Dec 1;88(11):4390-5.
110. Regan L, Braude PR, Hill DP. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. *Hum Reprod*. 1991 Feb;6(2):294-8.
111. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion*. 2009 Sep;49(9):1825-35.
112. van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MF, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FH. Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. *Hum Immunol*. 2002 Jun;63(6):452-8.

113. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):705-8.
114. SivaSai KS, Jendrisak M, Duffy BF, Phelan D, Ravenscraft M, Howard T, et al. Chimerism in peripheral blood of sensitized patients waiting for renal transplantation: clinical implications. *Transplantation*. 2000 Feb 27;69(4):538-44.
115. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):190-202.
116. Everett ET, Kao KJ, Scornik JC. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. *Transplantation*. 1987 Jul;44(1):123-9.
117. Opelz G, Graver B, Mickey MR, Terasaki PI. Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients. *Transplantation*. 1981 Sep;32(3):177-83.
118. Scornik JC, Pfaff WW, Howard RJ, Fennell RS, 3rd, Ramos E, Peterson JC, et al. Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation*. 1994 Dec 27;58(12):1361-5.
119. Karpinski M, Pochinco D, Dembinski I, Laidlaw W, Zacharias J, Nickerson P. Leukocyte reduction of red blood cell transfusions does not decrease allosensitization rates in potential kidney transplant candidates. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):818-24.
120. Kakaiya RM, Triulzi DJ, Wright DJ, Steele WR, Kleinman SH, Busch MP, et al. Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. *Transfusion*. 2010 Jun;50(6):1328-34.
121. Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*. 1987 Oct;30(4):161-6.
122. Sanfilippo FP, Bollinger RR, MacQueen JM, Brooks BJ, Koepke JA. A randomized study comparing leukocyte-depleted versus packed red cell transfusions in prospective cadaver renal allograft recipients. *Transfusion*. 1985 Mar-Apr;25(2):116-9.
123. van de Watering L, Hermans J, Witvliet M, Versteegh M, Brand A. HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Transfusion*. 2003 Jun;43(6):765-71.
124. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009 May 27;87(10):1505-13.
125. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*. 2013 Feb 15;95(3):410-7.
126. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013 Jun;13(6):1541-8.
127. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1157-67.
128. Marrari M, Duquesnoy RJ. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. *Transpl Immunol*. 2010 Feb;22(3-4):105-9.
129. Del Bello A, Congy N, Sallusto F, Cardeau-Desangles I, Fort M, Esposito L, et al. Anti-human leukocyte antigen immunization after early allograft nephrectomy. *Transplantation*. 2012 May 15;93(9):936-41.
130. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, Guilbeau-Frugier C, Cardeau-Desangles I, Fort M, et al. Donor-specific antibodies after ceasing immunosuppressive therapy, with or without an allograft nephrectomy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;7(8):1310-9.

131. Collins ZV, Arnold PF, Peetoom F, Smith GS, Walford RL. A naturally occurring monospecific anti-HL-A8 isoantibody. *Tissue Antigens*. 1973;3(5):358-63.
132. Tongio MM, Falkenrodt A, Mitsuishi Y, Urlacher A, Bergerat JP, North ML, et al. Natural HLA antibodies. *Tissue Antigens*. 1985 Nov;26(5):271-85.
133. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1111-5.
134. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science*. 1970 May 29;168(3935):1095-6.
135. Hirata AA, McIntire FC, Terasaki PI, Mittal KK. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. *Transplantation*. 1973 May;15(5):441-5.
136. Archer JR. Search for cross-reactivity between HLA B27 and *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Rheum Dis*. 1981 Aug;40(4):400-3.
137. Raybourne RB, Bunning VK, Williams KM. Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of *Shigella* species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. *J Immunol*. 1988 May 15;140(10):3489-95.
138. Gross U, Chen JH, Kono DH, Yu DT. A ribosomal protein of *Yersinia pseudotuberculosis* having partial epitope identity with HLA-B27. *Autoimmunity*. 1990;7(4):267-77.
139. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E-positive sera. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1935-48.
140. Calderon TE, Ferrero M, Marino GM, Cordoba A, Beltramo D, Muino JC, et al. Meat-specific IgG and IgA antibodies coexist with IgE antibodies in sera from allergic patients: clinical association and modulation by exclusion diet. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010 Jul-Sep;24(3):261-71.
141. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. 2013 Jan 26;381(9863):313-9.
142. Tavora F, Munivenkatappa R, Papadimitriou J, Drachenberg C, Sailey C, Mehra M, et al. Endothelitis in cardiac allograft biopsy specimens: possible relationship to antibody-mediated rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Apr;30(4):435-44.
143. Sellares J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant*. 2013 Apr;13(4):971-83.
144. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009 Oct;9(10):2312-23.
145. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant*. 2013 Nov;13(11):2865-74.
146. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969 Apr 3;280(14):735-9.
147. Murata K, Baldwin WM, 3rd. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009 Jul;23(3):139-50.
148. Haas M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013 Jun;18(3):319-26.
149. Wasowska BA, Lee CY, Halushka MK, Baldwin WM, 3rd. New concepts of complement in allorecognition and graft rejection. *Cell Immunol*. 2007 Jul;248(1):18-30.

150. Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant*. 2010 Mar;10(3):510-7.
151. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):849-59.
152. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol*. 2007 Apr;28(4):184-92.
153. Tang AH, Platt JL. Accommodation of grafts: implications for health and disease. *Hum Immunol*. 2007 Aug;68(8):645-51.
154. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Miyatake T, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med*. 1997 Feb;3(2):196-204.
155. Park WD, Grande JP, Ninova D, Nath KA, Platt JL, Gloor JM, et al. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am J Transplant*. 2003 Aug;3(8):952-60.
156. Uehara S, Chase CM, Cornell LD, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis. *Am J Transplant*. 2007 Jan;7(1):57-65.
157. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. *Am J Transplant*. 2008 Aug;8(8):1662-72.
158. Cicciarelli JC, Kasahara N, Lemp NA, Adamson R, Dembitsky W, Browne B, et al. Immunoglobulin G subclass analysis of HLA donor specific antibodies in heart and renal transplant recipients. *Clin Transpl*. 2013:413-22.
159. Kaneku H, O'Leary JG, Taniguchi M, Susskind BM, Terasaki PI, Klintmalm GB. Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are associated with chronic rejection and graft loss after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2012 Aug;18(8):984-92.
160. Kushihata F, Watanabe J, Mulder A, Claas F, Scornik JC. Human leukocyte antigen antibodies and human complement activation: role of IgG subclass, specificity, and cytotoxic potential. *Transplantation*. 2004 Oct 15;78(7):995-1001.
161. Schaub S, Honger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation*. 2014 Aug 27;98(4):387-93.
162. Griffiths EJ, Nelson RE, Dupont PJ, Warrens AN. Skewing of pretransplant anti-HLA class I antibodies of immunoglobulin G isotype solely toward immunoglobulin G1 subclass is associated with poorer renal allograft survival. *Transplantation*. 2004 Jun 15;77(11):1771-3.
163. Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation*. 2013 May 15;95(9):1113-9.
164. Arnold ML, Ntokou IS, Doxiadis II, Spriewald BM, Boletis JN, Iniotaki AG. Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies. *Transpl Int*. 2014 Mar;27(3):253-61.
165. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol*. 2013 May;74(5):666-72.
166. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Aug 20.

167. Honger G, Wahrmann M, Amico P, Hopfer H, Bohmig GA, Schaub S. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2010 Jun 27;89(12):1471-5.
168. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, Kendrick WT, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation*. 2014 Mar 15;97(5):494-501.
169. Chin C, Chen G, Sequeria F, Berry G, Siehr S, Bernstein D, et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Feb;30(2):158-63.
170. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2011 Jul 15;92(1):41-7.
171. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol*. 2011 Oct;72(10):849-58.
172. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013 Sep 26;369(13):1215-26.
173. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Feb;26(2):457-67.
174. Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol*. 2013 Dec;29(1-4):28-33.
175. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Systematic comparison of four cell- and Luminex-based methods for assessment of complement-activating HLA antibodies. *Transplantation*. 2013 Mar 15;95(5):694-700.
176. Goulabchand R, Vincent T, Batteux F, Eliaou JF, Guilpain P. Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2014 Jul;13(7):742-50.
177. Jefferis R, Lund J, Goodall M. Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation. *Immunol Lett*. 1995 Jan;44(2-3):111-7.
178. Lux A, Nimmerjahn F. Impact of differential glycosylation on IgG activity. *Adv Exp Med Biol*. 2011;780:113-24.
179. Mannam VK, Lewis RE, Cruse JM. The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium. *Exp Mol Pathol*. 2013 Apr;94(2):398-411.
180. AlMahri A, Holgersson J, Alheim M. Detection of complement-fixing and non-fixing antibodies specific for endothelial precursor cells and lymphocytes using flow cytometry. *Tissue Antigens*. 2012 Nov;80(5):404-15.
181. Jane-Wit D, Manes TD, Yi T, Qin L, Clark P, Kirkiles-Smith NC, et al. Alloantibody and complement promote T cell-mediated cardiac allograft vasculopathy through noncanonical nuclear factor-kappaB signaling in endothelial cells. *Circulation*. 2013 Dec 3;128(23):2504-16.
182. Bay JT, Schejbel L, Madsen HO, Sorensen SS, Hansen JM, Garred P. Low C4 gene copy numbers are associated with superior graft survival in patients transplanted with a deceased donor kidney. *Kidney Int*. 2013 Sep;84(3):562-9.
183. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Dec;32(12):1147-62.
184. Fishbein GA, Fishbein MC. Morphologic and immunohistochemical findings in antibody-mediated rejection of the cardiac allograft. *Hum Immunol*. 2012 Dec;73(12):1213-7.

185. Xu L, Collins J, Drachenberg C, Kukuruga D, Burke A. Increased macrophage density of cardiac allograft biopsies is associated with antibody-mediated rejection and alloantibodies to HLA antigens. *Clin Transplant*. 2014 May;28(5):554-60.
186. Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Ramos E, Kukuruga D, Klassen DK, Ugarte R, et al. Antibody-mediated allograft rejection: morphologic spectrum and serologic correlations in surveillance and for cause biopsies. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):128-36.
187. DeNicola MM, Weigt SS, Belperio JA, Reed EF, Ross DJ, Wallace WD. Pathologic findings in lung allografts with anti-HLA antibodies. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Mar;32(3):326-32.
188. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2010 Aug;10(8):1812-22.
189. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, Mengel M, Chang J, Halloran PF. Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1180-91.
190. Resch T, Fabritius C, Ebner S, Ritschl P, Kotsch K. The Role of Natural Killer Cells in Humoral Rejection. *Transplantation*. 2015 Jul;99(7):1335-40.
191. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant*. 2012 Feb;12(2):313-21.
192. Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M. Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):2252-60.
193. Shin BH, Ge S, Mirocha J, Karasyov A, Vo A, Jordan SC, et al. Regulation of anti-HLA antibody-dependent natural killer cell activation by immunosuppressive agents. *Transplantation*. 2014 Feb 15;97(3):294-300.
194. Christen T, Nahrendorf M, Wildgruber M, Swirski FK, Aikawa E, Waterman P, et al. Molecular imaging of innate immune cell function in transplant rejection. *Circulation*. 2009 Apr 14;119(14):1925-32.
195. Valenzuela NM, Mulder A, Reed EF. HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial P-selectin and, depending on subclass, by engaging FcγRs. *J Immunol*. 2013 Jun 15;190(12):6635-50.
196. Valenzuela NM, Trinh KR, Mulder A, Morrison SL, Reed EF. Monocyte recruitment by HLA IgG-activated endothelium: the relationship between IgG subclass and FcγRIIIa polymorphisms. *Am J Transplant*. 2015 Jun;15(6):1502-18.
197. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):803-15.
198. Li F, Zhang X, Jin YP, Mulder A, Reed EF. Antibody ligation of human leukocyte antigen class I molecules stimulates migration and proliferation of smooth muscle cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Hum Immunol*. 2011 Dec;72(12):1150-9.
199. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2459-65.
200. Jin YP, Korin Y, Zhang X, Jindra PT, Rozengurt E, Reed EF. RNA interference elucidates the role of focal adhesion kinase in HLA class I-mediated focal adhesion complex formation and proliferation in human endothelial cells. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):7911-22.
201. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, Claas F, Veale J, Jin YP, et al. Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation*. 2006 Jul 15;82(1 Suppl):S33-5.

202. Jindra PT, Jin YP, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2357-66.
203. Naemi FM, Carter V, Kirby JA, Ali S. Anti-donor HLA class I antibodies: pathways to endothelial cell activation and cell-mediated allograft rejection. *Transplantation*. 2013 Aug 15;96(3):258-66.
204. Valenzuela NM, Hong L, Shen XD, Gao F, Young SH, Rozengurt E, et al. Blockade of p-selectin is sufficient to reduce MHC I antibody-elicited monocyte recruitment in vitro and in vivo. *Am J Transplant*. 2013 Feb;13(2):299-311.
205. Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, Cameron SJ, Bao C, Fox-Talbot K, et al. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 23;104(4):1301-6.
206. Kuo HH, Fan R, Dvorina N, Chiesa-Vottero A, Baldwin WM, 3rd. Platelets in early antibody-mediated rejection of renal transplants. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Apr;26(4):855-63.
207. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, Jindra PT, Hong LS, Ayele P, et al. Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts. *Am J Transplant*. 2006 Jul;6(7):1560-71.
208. Smith JD, Lawson C, Yacoub MH, Rose ML. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int Immunol*. 2000 Apr;12(4):563-71.
209. Rahimi S, Qian Z, Layton J, Fox-Talbot K, Baldwin WM, 3rd, Wasowska BA. Non-complement- and complement-activating antibodies synergize to cause rejection of cardiac allografts. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):326-34.
210. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, Moreau K, Morel D, Merville P, et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2011 Jul;11(7):1543-4.
211. Bachelet T, Martinez C, Del Bello A, Couzi L, Keiji S, Guidicelli G, et al. Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2015 Aug 6.
212. Tran TH, Dohler B, Heinold A, Scherer S, Ruhenstroth A, Opelz G. Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation*. 2011 Aug 27;92(4):419-25.
213. Qiu J, Cai J, Terasaki PI, El-Awar N, Lee JH. Detection of antibodies to HLA-DP in renal transplant recipients using single antigen beads. *Transplantation*. 2005 Nov 27;80(10):1511-3.
214. Tambur AR, Leventhal JR, Friedewald JJ, Ramon DS. The complexity of human leukocyte antigen (HLA)-DQ antibodies and its effect on virtual crossmatching. *Transplantation*. 2010 Nov 27;90(10):1117-24.
215. Tambur AR, Leventhal JR, Zitzner JR, Walsh RC, Friedewald JJ. The DQ barrier: improving organ allocation equity using HLA-DQ information. *Transplantation*. 2013 Feb 27;95(4):635-40.
216. Smith JD, Danskin AJ, Laylor RM, Rose ML, Yacoub MH. The effect of panel reactive antibodies and the donor specific crossmatch on graft survival after heart and heart-lung transplantation. *Transpl Immunol*. 1993;1(1):60-5.
217. Singh G, Thompson M, Griffith B, Bernstein R, Rabin BS, Hardesty R, et al. Histocompatibility in cardiac transplantation with particular reference to immunopathology of positive serologic crossmatch. *Clin Immunol Immunopathol*. 1983 Jul;28(1):56-66.
218. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation*. 2011 Mar 15;91(5):527-35.

219. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug;21(8):1398-406.
220. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Dec;23(12):2061-71.
221. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant*. 2012 Jun;12(6):1618-23.
222. Mohanakumar T, Rhodes C, Mendez-Picon G, Goldman M, Moncure C, Lee H. Renal allograft rejection associated with presensitization to HLA-DR antigens. *Transplantation*. 1981 Jan;31(1):93-5.
223. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2132-43.
224. Smith JD, Hamour IM, Banner NR, Rose ML. C4d fixing, luminex binding antibodies - a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2809-15.
225. Stastny P, Lavingia B, Fixler DE, Yancy CW, Ring WS. Antibodies against donor human leukocyte antigens and the outcome of cardiac allografts in adults and children. *Transplantation*. 2007 Sep 27;84(6):738-45.
226. Ho EK, Vlad G, Colovai AI, Vasilescu ER, Schwartz J, Sondermeijer H, et al. Alloantibodies in heart transplantation. *Hum Immunol*. 2009 Oct;70(10):825-9.
227. Przybylowski P, Balogna M, Radovancevic B, Frazier OH, Susskind B, Van Buren C, et al. The role of flow cytometry-detected IgG and IgM anti-donor antibodies in cardiac allograft recipients. *Transplantation*. 1999 Jan 27;67(2):258-62.
228. Tambur AR, Bray RA, Takemoto SK, Mancini M, Costanzo MR, Kobashigawa JA, et al. Flow cytometric detection of HLA-specific antibodies as a predictor of heart allograft rejection. *Transplantation*. 2000 Oct 15;70(7):1055-9.
229. Brugiére O, Suberbielle C, Thabut G, Lhuillier E, Dauriat G, Metivier AC, et al. Lung transplantation in patients with pretransplantation donor-specific antibodies detected by Luminex assay. *Transplantation*. 2013 Mar 15;95(5):761-5.
230. Smith JD, Ibrahim MW, Newell H, Danskin AJ, Soresi S, Burke MM, et al. Pre-transplant donor HLA-specific antibodies: characteristics causing detrimental effects on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):1074-82.
231. Scornik JC, Zander DS, Baz MA, Donnelly WH, Staples ED. Susceptibility of lung transplants to preformed donor-specific HLA antibodies as detected by flow cytometry. *Transplantation*. 1999 Nov 27;68(10):1542-6.
232. Freese DK, Snover DC, Sharp HL, Gross CR, Savick SK, Payne WD. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology*. 1991 May;13(5):882-91.
233. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery*. 1986 Oct;100(4):705-15.
234. Taner T, Gandhi MJ, Sanderson SO, Poterucha CR, De Goey SR, Stegall MD, et al. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *Am J Transplant*. 2012 Jun;12(6):1504-10.
235. Ratner LE, Phelan D, Brunt EM, Mohanakumar T, Hanto DW. Probable antibody-mediated failure of two sequential ABO-compatible hepatic allografts in a single recipient. *Transplantation*. 1993 Apr;55(4):814-9.

236. Neau-Cransac M, Le Bail B, Guidicelli G, Visentin J, Moreau K, Quinart A, et al. Evolution of serum and intra-graft donor-specific anti-HLA antibodies in a patient with two consecutive liver transplantations. *Transpl Immunol*. 2015 Oct;33(2):58-62.
237. Batts KP, Moore SB, Perkins JD, Wiesner RH, Grambsch PM, Krom RA. Influence of positive lymphocyte crossmatch and HLA mismatching on vanishing bile duct syndrome in human liver allografts. *Transplantation*. 1988 Feb;45(2):376-9.
238. Takaya S, Bronsther O, Iwaki Y, Nakamura K, Abu-Elmagd K, Yagihashi A, et al. The adverse impact on liver transplantation of using positive cytotoxic crossmatch donors. *Transplantation*. 1992 Feb;53(2):400-6.
239. Nikaein A, Backman L, Jennings L, Levy MF, Goldstein R, Gonwa T, et al. HLA compatibility and liver transplant outcome. Improved patient survival by HLA and cross-matching. *Transplantation*. 1994 Oct 15;58(7):786-92.
240. Charco R, Vargas V, Balsells J, Lazaro JL, Murio E, Jaurrieta E, et al. Influence of anti-HLA antibodies and positive T-lymphocytotoxic crossmatch on survival and graft rejection in human liver transplantation. *J Hepatol*. 1996 Apr;24(4):452-9.
241. Musat AI, Pigott CM, Ellis TM, Agni RM, Leverson GE, Powell AJ, et al. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver Transpl*. 2013 Oct;19(10):1132-41.
242. Hori T, Egawa H, Takada Y, Oike F, Ogura Y, Ogawa K, et al. Fatal impact of lymphocyte cross-matching upon humoral rejection after adult living related liver transplantation. *Transpl Int*. 2010 Mar 1;23(3):338-40.
243. Hori T, Uemoto S, Takada Y, Oike F, Ogura Y, Ogawa K, et al. Does a positive lymphocyte cross-match contraindicate living-donor liver transplantation? *Surgery*. 2010 Jun;147(6):840-4.
244. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, et al. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transplant*. 2011 Sep;11(9):1868-76.
245. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, Noor M, Barnes T, Gugliuzza K. Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation*. 2006 Dec 15;82(11):1524-8.
246. Bray RA, Nolen JD, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, et al. Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant*. 2006 Oct;6(10):2307-15.
247. Tambur AR, Leventhal J, Kaufman DB, Friedewald J, Miller J, Abecassis MM. Tailoring antibody testing and how to use it in the calculated panel reactive antibody era: the Northwestern University experience. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1052-9.
248. Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Sharples LD, Prezzi D, Morgan CH, Key T, et al. Ten-year experience of selective omission of the pretransplant crossmatch test in deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2010 Jan 27;89(2):185-93.
249. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am J Transplant*. 2011 Apr;11(4):719-24.
250. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000 Feb 15;69(3):319-26.
251. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012 Jul 27;94(2):172-7.
252. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2532-41.

253. Devos JM, Gaber AO, Teeter LD, Graviss EA, Patel SJ, Land GA, et al. Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection. *Transplantation*. 2014 Mar 15;97(5):534-40.
254. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thaunat O, Dubois V, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jun 5.
255. Ho EK, Vlad G, Vasilescu ER, de la Torre L, Colovai AI, Burke E, et al. Pre- and posttransplantation allosensitization in heart allograft recipients: major impact of de novo alloantibody production on allograft survival. *Hum Immunol*. 2011 Jan;72(1):5-10.
256. Smith JD, Banner NR, Hamour IM, Ozawa M, Goh A, Robinson D, et al. De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. *Am J Transplant*. 2011 Feb;11(2):312-9.
257. Hodges AM, Lyster H, McDermott A, Rice AJ, Smith JD, Rose ML, et al. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation following the development of de novo donor-specific human leukocyte antigen antibody. *Transplantation*. 2012 Mar 27;93(6):650-6.
258. Zhang Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK, et al. HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation*. 2011 May 27;91(10):1153-8.
259. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Nov;24(11):1710-20.
260. Frank R, Molina MR, Wald JW, Goldberg LR, Kamoun M, Lal P. Correlation of circulating donor-specific anti-HLA antibodies and presence of C4d in endomyocardial biopsy with heart allograft outcomes: a single-center, retrospective study. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Apr;32(4):410-7.
261. Nath DS, Angaswamy N, Basha HI, Phelan D, Moazami N, Ewald GA, et al. Donor-specific antibodies to human leukocyte antigens are associated with and precede antibodies to major histocompatibility complex class I-related chain A in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Hum Immunol*. 2010 Dec;71(12):1191-6.
262. Gimita AL, McCurry KR, Iacono AT, Duquesnoy R, Corcoran TE, Awad M, et al. HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Oct;23(10):1135-41.
263. Snyder LD, Wang Z, Chen DF, Reinsmoen NL, Finlen-Copeland CA, Davis WA, et al. Implications for human leukocyte antigen antibodies after lung transplantation: a 10-year experience in 441 patients. *Chest*. 2013 Jul;144(1):226-33.
264. Safavi S, Robinson DR, Soresi S, Carby M, Smith JD. De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Dec;33(12):1273-81.
265. Witt CA, Gaut JP, Yusen RD, Byers DE, Iuppa JA, Bennett Bain K, et al. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Oct;32(10):1034-40.
266. Lobo LJ, Aris RM, Schmitz J, Neuringer IP. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013 Jan;32(1):70-7.
267. Morrell MR, Pilewski JM, Gries CJ, Pipeling MR, Crespo MM, Ensor CR, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Dec;33(12):1288-94.

268. Hachem RR, Yusen RD, Meyers BF, Aloush AA, Mohanakumar T, Patterson GA, et al. Anti-human leukocyte antigen antibodies and preemptive antibody-directed therapy after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Sep;29(9):973-80.
269. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Jun;8(6):348-57.
270. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014 Feb;14(2):272-83.
271. Astor TL, Weill D, Cool C, Teitelbaum I, Schwarz MI, Zamora MR. Pulmonary capillaritis in lung transplant recipients: treatment and effect on allograft function. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Dec;24(12):2091-7.
272. Yousem SA, Zeevi A. The histopathology of lung allograft dysfunction associated with the development of donor-specific HLA alloantibodies. *Am J Surg Pathol*. 2012 Jul;36(7):987-92.
273. O'Leary JG, Michelle Shiller S, Bellamy C, Nalesnik MA, Kaneku H, Jennings LW, et al. Acute liver allograft antibody-mediated rejection: an inter-institutional study of significant histopathological features. *Liver Transpl*. 2014 Oct;20(10):1244-55.
274. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, Rahman MH, Racusen LC, Bagnasco SM, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):576-85.
275. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2561-70.
276. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010 Mar;10(3):464-71.
277. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, Duong van Huyen JP, Glotz D, Suberbielle C, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011 May;22(5):975-83.
278. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2520-31.
279. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation*. 2010 Jul 15;90(1):68-74.
280. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009 Mar;9(3):527-35.
281. Lu WH, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perens G, et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Sep;30(9):1044-50.
282. Angelini A, Castellani C, Fedrigo M, de Boer OJ, Meijer-Jorna LB, Li X, et al. Coronary cardiac allograft vasculopathy versus native atherosclerosis: difficulties in classification. *Virchows Arch*. 2014 Jun;464(6):627-35.
283. Avery RK. Cardiac-allograft vasculopathy. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28;349(9):829-30.
284. Loupy A, Toquet C, Rouvier P, Beuscart T, Bories MC, Varnous S, et al. Late Failing Heart Allografts: Pathology of Cardiac Allograft Vasculopathy and Association With Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2015 Nov 20.
285. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006 Oct 13;99(8):801-15.

286. Stoica SC, Cafferty F, Pauriah M, Taylor CJ, Sharples LD, Wallwork J, et al. The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Apr;25(4):420-5.
287. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, et al. Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):962-70.
288. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant*. 2002 Mar;21(3):297-310.
289. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Jul;30(7):735-42.
290. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, et al. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J*. 2014 Dec;44(6):1479-503.
291. Cooper JD, Billingham M, Egan T, Hertz MI, Higenbottam T, Lynch J, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. *International Society for Heart and Lung Transplantation*. *J Heart Lung Transplant*. 1993 Sep-Oct;12(5):713-6.
292. O'Leary JG, Cai J, Freeman R, Banuelos N, Hart B, Johnson M, et al. Proposed Diagnostic Criteria for Chronic Antibody-Mediated Rejection in Liver Allografts. *Am J Transplant*. 2015 Oct 15.
293. Montgomery RA. Renal transplantation across HLA and ABO antibody barriers: integrating paired donation into desensitization protocols. *Am J Transplant*. 2010 Mar;10(3):449-57.
294. Jordan SC, Vo AA, Tyan D, Nast CC, Toyoda M. Current approaches to treatment of antibody-mediated rejection. *Pediatr Transplant*. 2005 Jun;9(3):408-15.
295. Warren DS, Montgomery RA. Incompatible kidney transplantation: lessons from a decade of desensitization and paired kidney exchange. *Immunol Res*. 2010 Jul;47(1-3):257-64.
296. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, Leffell MS, King KE, Burdick J, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation*. 2000 Sep 27;70(6):887-95.
297. Shah A, Nadasdy T, Arend L, Brennan J, Leong N, Coppage M, et al. Treatment of C4d-positive acute humoral rejection with plasmapheresis and rabbit polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1399-405.
298. Morath C, Beimler J, Opelz G, Scherer S, Schmidt J, Macher-Goeppinger S, et al. Living donor kidney transplantation in crossmatch-positive patients enabled by peritransplant immunoadsorption and anti-CD20 therapy. *Transpl Int*. 2012 May;25(5):506-17.
299. Bartel G, Wahrmann M, Regele H, Kikic Z, Fischer G, Druml W, et al. Peritransplant immunoadsorption for positive crossmatch deceased donor kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2010 Sep;10(9):2033-42.
300. Palmer A, Taube D, Welsh K, Bewick M, Gjorstrup P, Thick M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet*. 1989 Jan 7;1(8628):10-2.
301. Gloor JM, Winters JL, Cornell LD, Fix LA, DeGoey SR, Knauer RM, et al. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2010 Mar;10(3):582-9.

302. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive crossmatch kidney transplant recipients treated with eculizumab: outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant*. 2015 May;15(5):1293-302.
303. Vo AA, Zeevi A, Choi J, Cisneros K, Toyoda M, Kahwaji J, et al. A phase I/II placebo-controlled trial of C1-inhibitor for prevention of antibody-mediated rejection in HLA sensitized patients. *Transplantation*. 2015 Feb;99(2):299-308.
304. Cooper JE, Gralla J, Klem P, Chan L, Wiseman AC. High dose intravenous immunoglobulin therapy for donor-specific antibodies in kidney transplant recipients with acute and chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 2014 Jun 27;97(12):1253-9.
305. Bachelet T, Nodimar C, Taupin JL, Lepreux S, Moreau K, Morel D, et al. Intravenous immunoglobulins and rituximab therapy for severe transplant glomerulopathy in chronic antibody-mediated rejection: a pilot study. *Clin Transplant*. 2015 May;29(5):439-46.
306. Jordan SC, Toyoda M, Vo AA. Intravenous immunoglobulin a natural regulator of immunity and inflammation. *Transplantation*. 2009 Jul 15;88(1):1-6.
307. Vo AA, Peng A, Toyoda M, Kahwaji J, Cao K, Lai CH, et al. Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation*. 2010 May 15;89(9):1095-102.
308. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):996-1001.
309. Garrett HE, Jr., Groshart K, Duvall-Seaman D, Combs D, Suggs R. Treatment of humoral rejection with rituximab. *Ann Thorac Surg*. 2002 Oct;74(4):1240-2.
310. Wong W, Lee RA, Saidman SL, Smith RN, Zorn E. Bortezomib in kidney transplant recipients with antibody mediated rejection: three case reports. *Clin Transpl*. 2009:401-5.
311. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009 Jan;9(1):201-9.
312. Cicora F, Paz M, Mos F, Roberti J. Use of bortezomib to treat anti-HLA antibodies in renal transplant patients: a single-center experience. *Transpl Immunol*. 2013 Dec;29(1-4):7-10.
313. Everly MJ, Terasaki PI, Trivedi HL. Durability of antibody removal following proteasome inhibitor-based therapy. *Transplantation*. 2012 Mar 27;93(6):572-7.
314. Anglicheau D, Loupy A, Suberbielle C, Zuber J, Patey N, Noel LH, et al. Posttransplant prophylactic intravenous immunoglobulin in kidney transplant patients at high immunological risk: a pilot study. *Am J Transplant*. 2007 May;7(5):1185-92.
315. Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, Moore SB, Prieto M, Nyberg SL, et al. Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2003 Aug;3(8):1017-23.
316. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai CH, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med*. 2008 Jul 17;359(3):242-51.
317. Doxiadis II, Roelen D, Claas FH. Mature wines are better: CDC as the leading method to define highly sensitized patients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Dec;15(6):716-9.
318. Iwaki Y, Lau M, Cook DJ, Takemoto S, Terasaki PI. Crossmatching with B and T cells and flow cytometry. *Clin Transpl*. 1986:277-84.
319. Buelow R, Chiang TR, Monteiro F, Cornejo MC, Ellingson L, Claas F, et al. Soluble HLA antigens and ELISA--a new technology for crossmatch testing. *Transplantation*. 1995 Dec 27;60(12):1594-9.
320. Worthington JE, Robson AJ, Sheldon S, Langton A, Martin S. A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies. *Hum Immunol*. 2001 Oct;62(10):1178-84.

321. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation*. 2003 Jan 15;75(1):43-9.
322. El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol*. 2005 Sep;66(9):989-97.
323. Reed EF, Rao P, Zhang Z, Gebel H, Bray RA, Guleria I, et al. Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant*. 2013 Jul;13(7):1859-70.
324. Gandhi MJ, Degoey S, Falbo D, Jenkins S, Stubbs JR, Noreen H, et al. Inter and intra laboratory concordance of HLA antibody results obtained by single antigen bead based assay. *Hum Immunol*. 2013 Mar;74(3):310-7.
325. Riethmuller S, Ferrari-Lacraz S, Muller MK, Raptis DA, Hadaya K, Rusi B, et al. Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2010 Jul 27;90(2):160-7.
326. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Pochinco D, Birk PE, Ho J, et al. Rates and Determinants of Progression to Graft Failure in Kidney Allograft Recipients With De Novo Donor-Specific Antibody. *Am J Transplant*. 2015 Nov;15(11):2921-30.
327. Kannabhiran D, Lee J, Schwartz JE, Friedlander R, Aull M, Muthukumar T, et al. Characteristics of Circulating Donor Human Leukocyte Antigen-specific Immunoglobulin G Antibodies Predictive of Acute Antibody-mediated Rejection and Kidney Allograft Failure. *Transplantation*. 2015 Jun;99(6):1156-64.
328. Cooper JE, Gralla J, Chan L, Wiseman AC. Clinical significance of post kidney transplant de novo DSA in otherwise stable grafts. *Clin Transpl*. 2011:359-64.
329. Irving CA, Carter V, Gennery AR, Parry G, Griselli M, Hasan A, et al. Effect of persistent versus transient donor-specific HLA antibodies on graft outcomes in pediatric cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Oct;34(10):1310-7.
330. Gloor JM, Moore SB, Schneider BA, Degoey SR, Stegall MD. The effect of antithymocyte globulin on anti-human leukocyte antigen antibody detection assays. *Transplantation*. 2007 Jul 27;84(2):258-64.
331. Ravindranath MH, Terasaki PI, Pham T, Jucaud V, Kawakita S. Therapeutic preparations of IVIg contain naturally occurring anti-HLA-E antibodies that react with HLA-Ia (HLA-A/-B/-Cw) alleles. *Blood*. 2013 Mar 14;121(11):2013-28.
332. Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol*. 2009 Jul;70(7):496-501.
333. Kosmoliaptis V, O'Rourke C, Bradley JA, Taylor CJ. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol*. 2010 Jan;71(1):45-9.
334. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*. 2011 Sep 15;92(5):510-5.
335. Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet*. 2013 Jun;40(3):171-7.
336. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, Dubois V, Moreau JF, Merville P, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl Immunol*. 2013 Dec;29(1-4):17-21.
337. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant*. 2013 Aug;13(8):2075-82.

338. Polakova K, Karpatova M, Russ G. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol*. 1993 Oct;30(14):1223-30.
339. Sumitran-Karuppan S, Moller E. Acid treatment of lymphocytes selectively decreases the expression of HLA class I antigens: a method to confirm that a positive clinical crossmatch test was due to class I antibodies. *Transpl Immunol*. 1996 Jun;4(2):163-8.
340. Schnabl E, Stockinger H, Majdic O, Gaugitsch H, Lindley IJ, Maurer D, et al. Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1431-42.
341. Pickl WF, Holter W, Stockl J, Majdic O, Knapp W. Expression of beta 2-microglobulin-free HLA class I alpha-chains on activated T cells requires internalization of HLA class I heterodimers. *Immunology*. 1996 May;88(1):104-9.
342. Bodnar A, Bacso Z, Jenei A, Jovin TM, Edidin M, Damjanovich S, et al. Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*. 2003 Mar;15(3):331-9.
343. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol*. 2009 Oct;70(10):844-53.
344. Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, Carmagnat M, Candon S, Thervet E, et al. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant*. 2014 Jan;14(1):193-201.
345. Jacob EK, De Goey SR, Gandhi MJ. Positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch results in two cases. *Transpl Immunol*. 2011 Jul;25(1):77-81.
346. Nikaein A, El-Awar N, Hunt J, Rosenthal EJ, Eichhorn E, Hall S, et al. Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant*. 2012 May;31(5):443-7.
347. Pereira S, Perkins S, Lee JH, Shumway W, LeFor W, Lopez-Cepero M, et al. Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol*. 2011 Jun;72(6):492-8.
348. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schonemann C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation*. 2009 Jul 27;88(2):226-30.
349. Cai J, Terasaki PI, Zhu D, Lachmann N, Schonemann C, Everly MJ, et al. Complement-fixing antibodies against denatured HLA and MICA antigens are associated with antibody mediated rejection. *Exp Mol Pathol*. 2015 Nov 23.
350. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, van Eck M, van Ginkel WG, Hene RJ, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leukocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2013 Sep;173(3):536-43.
351. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG with rejection and graft failure. *Transpl Int*. 2015 Aug 12.
352. Paantjens AW, van de Graaf EA, Kwakkel-van Erp JM, Hoefnagel T, van Ginkel WG, Fakhry F, et al. The Induction of IgM and IgG Antibodies against HLA or MICA after Lung Transplantation. *Pulm Med*. 2011;2011:432169.
353. Suzuki M, Ishida H, Komatsu T, Kennoki T, Ishizuka T, Tanabe K. Kidney transplantation in a recipient with anti-HLA antibody IgM positive. *Transpl Immunol*. 2009 Jul;21(3):150-4.
354. Stastny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum Immunol*. 2009 Aug;70(8):600-4.

355. Arnold ML, Heinemann FM, Horn P, Ziemann M, Lachmann N, Muhlbacher A, et al. 16(th) IHIW: anti-HLA alloantibodies of the of IgA isotype in re-transplant candidates. *Int J Immunogenet.* 2013 Feb;40(1):17-20.
356. Koka P, Chia D, Terasaki PI, Chan H, Chia J, Ozawa M, et al. The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival. *Transplantation.* 1993 Jul;56(1):207-11.
357. Kerman RH, Susskind B, Buelow R, Regan J, Pouletty P, Williams J, et al. Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in pretransplant sera with renal allograft rejection. *Transplantation.* 1996 Jul 27;62(2):201-5.
358. Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation.* 2011 Feb 15;91(3):342-7.
359. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant.* 2012 Feb;16(1):12-7.
360. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2013 Jan;32(1):98-105.
361. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2015 Nov 4.
362. Bartel G, Brown K, Phillips R, Peng Q, Zhou W, Sacks SH, et al. Donor specific transplant tolerance is dependent on complement receptors. *Transpl Int.* 2013 Jan;26(1):99-108.
363. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. *Transplantation.* 2015 Jun;99(6):1151-5.
364. Jeannet M, Lambert PH. Immunological studies on eluates from human kidney grafts. *Clin Immunol Immunopathol.* 1975 Nov;4(4):478-88.
365. Metzgar RS, Seigler HF, Ward FE, Rowlands DT, Jr. Immunological studies on eluates from human renal allografts. *Transplantation.* 1972 Feb;13(2):131-7.
366. Heinemann FM, Roth I, Rebmann V, Arnold ML, Witzke O, Wilde B, et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):500-6.
367. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifle G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2003 Jul 27;76(2):395-400.
368. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol.* 2006 Mar;67(3):230-7.
369. Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Rifle G, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005 May 27;79(10):1459-61.
370. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, Legeret M, Pariscoat G, Guidicelli G, et al. Kidney intra-graft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. *Am J Transplant.* 2013 Nov;13(11):2855-64.
371. Tait BD. Antibodies to denatured human leukocyte antigen: relevant or just noise? *Transplantation.* 2014 Oct 15;98(7):695-6.

372. Grenzi PC, de Marco R, Silva RZ, Campos EF, Gerbase-DeLima M. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. *Hum Immunol*. 2013 Oct;74(10):1300-3.
373. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am J Transplant*. 2015 Apr 30.
374. Visentin J, Guidicelli G, Taupin JL. Assessing HLA Antibody Strength: Have We Thought About Everything? *Am J Transplant*. 2015 Dec;15(12):3271.
375. Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, Eskandary F, Bohmig GA. Complement Component C3 Activation: The Leading Cause of the Prozone Phenomenon Affecting HLA Antibody Detection on Single-Antigen Beads. *Transplantation*. 2014 Mar 11.

Propriétés des anticorps anti-HLA en transplantation d'organes

Les anticorps anti-HLA d'isotype IgG sont une cause de perte de greffon en transplantation d'organes. Les tests « single antigen » (SAFB) sont les outils les plus précis et sensibles pour l'identification des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (DSA) dans le sérum des receveurs. Leur résultat semi-quantitatif, la MFI, n'est pas parfaitement associé à l'issue clinique, ce qui pourrait être dû à plusieurs raisons.

Premièrement, nous avons montré que les SAFB de classe I détectent fréquemment des anticorps anti-HLA dénaturés de classe I, incapables de se lier à la surface cellulaire et donc n'ayant pas de signification clinique, alors qu'ils ont un impact négatif sur l'accès à la transplantation. Leur identification a été réalisée par un traitement acide des billes et par un SAFB modifié, les iBeads®. Ces deux tests montraient de bonnes fiabilité et concordance, mais le traitement acide pouvait parfois être mis en défaut alors que les iBeads® auraient une sensibilité légèrement inférieure aux SAFB classiques.

Deuxièmement, nous avons déchiffré l'interférence liée au complément : les IgG anti-HLA de forte MFI sont capables d'activer le complément à la surface des billes, conduisant à une accumulation des produits de dégradation du C4 et du C3, capables de réduire la détection des IgG anti-HLA. Nous avons également démontré que les IgM anti-HLA étaient capables d'interférer avec la détection des IgG à travers une compétition pour l'épitope, un encombrement stérique et une activation du complément.

Troisièmement, nous avons montré que la détection des DSA avec les SAFB dans les éluats de biopsies de poumons transplantés, prouve formelle que ces DSA interagissent avec le greffon, constituait un facteur de risque de perte du greffon. Nous avons également développé un système de capture en résonance plasmonique de surface permettant de déterminer la concentration et l'affinité des anticorps anti-HLA, ce qui pourrait permettre d'étudier la façon dont les DSA interagissent avec le greffon.

Mots clés : anticorps anti-HLA, single antigen flow beads, transplantation, interférence, DSA intra-greffon, concentration, affinité, résonance plasmonique de surface

Properties of HLA antibodies in organ transplantation

IgG HLA antibodies are a cause of graft loss in organ transplantation. The single antigen flow beads assays (SAFB) are the most precise and sensitive assays to identify donor specific HLA antibodies (DSA) in recipient's sera. Their semi-quantitative readout, the mean fluorescence intensity (MFI), is not perfectly associated with graft outcomes, which could be due to several factors.

Firstly, we showed that class I SAFB frequently detects denatured class I HLA antibodies which are unable to bind cell surface and then are clinically irrelevant, while they actually impact the access to a transplant. Their identification was performed through SAFB acid-treatment and a modified SAFB assay, the iBeads®. They had a high reliability and a good concordance, but the acid-treatment assay can be put at fault in a few cases whereas iBeads® appeared slightly less sensitive than classical SAFB.

Secondly, we deciphered the complement interference phenomenon: high MFI level IgG HLA antibodies activate the complement cascade at bead surface, leading to the deposition of C4 and C3 degradation products which are able to reduce IgG HLA antibodies detection. We also demonstrated that IgM HLA antibodies interfere with IgG detection through competition for the epitope, allosteric hindrance and complement activation.

Thirdly, we demonstrated that the detection of DSA with SAFB in lung biopsy eluates, proving that the DSA interact with the graft, was a risk factor for graft loss. We further developed a capture system in surface plasmon resonance allowing the concentration and affinity of HLA antibodies to be determined, which could allow the way that the DSA interact with the graft to be studied.

Keywords : HLA antibodies, single antigen flow beads, transplantation, interference, intra-graft DSA, concentration, affinity, surface plasmon resonance

Laboratoire d'accueil

Immunologie Conceptuelle, Expérimentale et Translationnelle (Immuno ConcEpT)
ex Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et Différenciation (CIRID)
UMR CNRS 5164 – Université de Bordeaux
Bâtiment 1B, 1^{er} étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex